

#6

PATENTS

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE****Applicant:** Akira Suyama, et al.**Examiner:** Unassigned**Serial No:** 09/893,205**Art Unit:** Unassigned**Filed:** June 27, 2001**Docket:** 14745**For:** NOVEL COMPUTATION WITH  
NUCLEIC ACID MOLECULES,  
COMPUTER AND SOFTWARE  
FOR COMPUTING**Dated:** September 18, 2001Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark Office  
Washington, D.C. 20231**CLAIM OF PRIORITY**

Sir:

Applicants in the above-identified application hereby claim the right of priority in connection with Title 35 U.S.C. § 119 and in support thereof, herewith submit certified copies of Japanese Patent Application Nos. 2000-382449 filed December 15, 2000 and 2000-399415 filed December 27, 2000.

Respectfully submitted,

Thomas Spinelli

Registration No.: 39,533

Scully, Scott, Murphy & Presser  
400 Garden City Plaza  
Garden City, New York 11530  
(516) 742-4343**CERTIFICATE OF MAILING UNDER 37 C.F.R. §1.8(a)**

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to: Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231 on September 18, 2001.

Dated: September 18, 2001

Mishelle Mustafa



日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2000年12月27日

出 願 番 号  
Application Number:

特願2000-399415

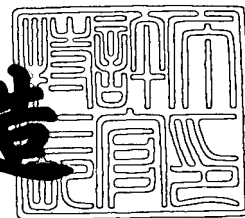
出 願 人  
Applicant(s):

オリンパス光学工業株式会社  
三井情報開発株式会社

2001年 6月20日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3058327

【書類名】 特許願

【整理番号】 A000007585

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【提出日】 平成12年12月27日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09  
G06F 15/18  
G06F 17/30

【発明の名称】 分子計算装置、分子計算方法および分子計算用ソフトウ  
エア

【請求項の数】 11

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都八王子市下柚木 3 - 2 - 6 - 5 0 1  
【氏名】 陶山 明

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス光学  
工業株式会社内  
【氏名】 森本 伸彦

【特許出願人】  
【識別番号】 000000376  
【氏名又は名称】 オリンパス光学工業株式会社

【特許出願人】  
【識別番号】 599000980  
【氏名又は名称】 三井情報開発株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100058479  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 鈴江 武彦

【電話番号】 03-3502-3181

【選任した代理人】

【識別番号】 100084618

【弁理士】

【氏名又は名称】 村松 貞男

【選任した代理人】

【識別番号】 100068814

【弁理士】

【氏名又は名称】 坪井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100091351

【弁理士】

【氏名又は名称】 河野 哲

【選任した代理人】

【識別番号】 100100952

【弁理士】

【氏名又は名称】 風間 鉄也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011567

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0010297

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 分子計算装置、分子計算方法および分子計算用ソフトウェア

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 電子計算部と分子計算部とを具備する分子計算装置であって、前記電子計算部が、実質的に分子計算部の機能を制御することを特徴とする分子計算装置。

【請求項 2】 電子計算部と分子計算部とを具備する分子計算装置であって、  
前記電子計算部においては、計算プログラムの定数および変数が符号分子表現に変換され、前記計算プログラムの手続の関数が対応する符号分子の演算反応に変換され、前記計算プログラムから前記演算反応の実行手順が作製され、且つ前記分子計算部においては、前記符号分子が保持され、前記実行手順に従い前記符号分子の演算反応が実行され、前記演算反応の結果が検出されることを特徴とする分子計算装置。

【請求項 3】 電子計算部と分子計算部とを具備する分子計算装置であって、前記電子計算部は、  
計算プログラム、計算プログラムの定数および変数を入力する手段、  
計算プログラムの定数および変数を符号分子に変換する手段、  
前記計算プログラムの手続関数を対応する符号分子の演算反応に変換する手段、  
前記計算プログラムから前記演算反応の実行手順を作製する手段、  
並びに前記演算反応の実行手順に従って前記分子計算部における演算反応を制御する手段を具備し、且つ  
前記分子計算部は、  
前記符号分子を用いて前記演算反応を実行する演算手段、および  
演算手段により実施された演算結果を検出する検出手段  
を具備することを特徴とする分子計算装置。

【請求項 4】 電子計算部と分子計算部とを具備する分子計算装置であって

、前記電子計算部は、

計算プログラム、計算プログラムの定数および変数を入力する手段、

計算プログラムの定数および変数を符号分子に変換する手段、

前記計算プログラムの手続き関数を対応する符号分子の演算反応に変換する手段、

前記計算プログラムから前記演算反応の実行手順を作製する手段、

前記演算反応の実行手順に従って前記分子計算部における演算反応を制御する手段、並びに

分子計算部において検出された演算結果を表示する手段を具備し、且つ

前記分子計算部は、

前記符号分子を用いて前記演算反応を実行する演算手段、および演算手段により実施された演算結果を検出する検出手段を具備することを特徴とする分子計算装置。

【請求項 5】 請求項 1 から 4 の何れか 1 項に記載の分子計算装置であって、更に、前記分子計算部が符号分子を合成する手段を具備する分子計算装置。

【請求項 6】 分子計算装置であって、

計算のための計算プログラムを入力する入力手段と、

入力された計算プログラムを記録する記憶手段と、

計算プログラム、計算プログラムの定数および変数を符号分子に割り当てるための分子変換テーブルを記録するための記憶手段と、

前記分子変換テーブルを読み出し、そこに含まれるデータを検索して対応するデータを読み出すことにより、計算プログラム、計算プログラムの定数および変数を符号分子に変換する変換手段と、

前記符号分子を合成する製造手段と、

前記計算プログラムを符号化分子の実験操作に変換するための手順変換テーブルを記録するための記憶手段と、

前記手順変換テーブルを読み出し、そこに含まれるデータを検索して対応するデータを読み出すことにより、実験操作に変換して実験計画を作成する計画作成手段と、

作成された実験計画に従って、駆動信号を出力する自動制御手段と、  
 前記自動制御手段からの駆動信号に従って、前記合成された符号分子を用いて、  
 前記実験操作を行う実験手段と、  
 前記実験操作の結果得られた符号化分子を検出する検出手段と、  
 検出結果を計算プログラムに記述された形式に加工する加工手段と、  
 前記加工により得られた結果を出力する出力手段と  
 を具備する分子計算装置。

【請求項 7】 請求項 1 から 6 の何れか 1 項に記載の分子計算装置であって、  
 前記分子が核酸であることを特徴とする分子計算装置。

【請求項 8】 電子計算部と分子計算部とを、電気学的プログラムが認識可能に表現された分子情報に基づいて一体的に機能させることを特徴とする分子計算方法。

【請求項 9】 電子計算部と分子計算部とを具備する分子計算装置に適用するためのソフトウェアであって、前記電子計算部および／または前記分子計算部に適用され、前記電子計算部による計算作業と前記分子計算部による計算作業とを、各計算部で電気学的に認識可能な情報形式で機能させることを特徴とする分子計算用ソフトウェア。

【請求項 10】 分子計算部により計算した情報を、電子計算部の電気学的プログラムに適合するような情報形式に変換する機能を有することを特徴とする請求項 9 記載の分子計算用ソフトウェア。

【請求項 11】 電子計算部により計算した情報を、分子計算部の計算作業に適合するような情報形式に変換する機能を有することを特徴とする請求項 9 記載の分子計算用ソフトウェア。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

核酸分子を使用する計算機に関する。

【0002】

【従来の技術】

半導体シリコンを用いた計算機はその誕生以来大きく性能を伸ばし、安価に複雑な計算をこなして人類に貢献してきた。これら半導体シリコンを用いた計算機は主に0と1の2値で計算を進めるノイマン型計算機である。

## 【0003】

計算機科学では巡回サラリーマン問題、3SAT（リテラル3個の充足可能性問題）などNP完全と呼ばれる解くことが困難な問題があることが知られている。従来、これらの問題は全ての可能な答えを網羅してひとつひとつ解かどうかを確認すること、或いは近似解を求めることにより解いている。しかし、近似解法で解いた場合は、得られた答えは解ではあるが最適解かどうかわからず、解を見落とす可能性もある。従って、全ての可能な答えを網羅する方法が厳密な解法となる。

## 【0004】

この網羅探索をノイマン型計算機で実施する場合には、非常に多くの計算を行うので高速な計算機が必要である。現在の技術では計算機を並列化し、多数の計算機で並行して計算することで網羅探索を行うと高速化できる。ところが計算機数が増加すれば消費電力が増え、より広い設置場所も要求される。また計算機を並列化するには計算機同士の通信をどうするか、どんな接続法を採用するかなど技術的課題も多い。また、NP問題は記憶容量を要するので装置のコストをさらに引き上げる。更に、NP問題は計算に要する時間が多項式により表せない問題であり、要求される計算時間が問題の規模に対して指数関数的に増加していく問題でもある。

## 【0005】

一方、ノイマン型計算機で解くのが難しい問題を解くのために、1994年にエイデルマン（Adleman）によってDNAコンピューティング（DNA computing）と称される新たな計算機パラダイムが提案された（Science, 266, 1021-4）。エイデルマンの思想は、DNA分子を、情報を記録したテープと見なし、情報処理の主体として酵素を用いることによって、チューリング機械の計算過程をDNA分子を用いて実行するというものである。即ち、エイデルマンは小規模な巡回セールスマン問題を説くために、DNAを



用いて経路に対応するDNAを形成させ、その中から解のDNAを選択する方法を用いた。また、DNA分子で加算を行うというグアニエリ (Guanieri) らによる報告もある (Science, 273, 220-3)。このように分子による演算の可能性についての探索が行われてきた。

## 【0006】

DNAを演算に用いると次のような点で有利であることが明らかになっている。例えば、数十塩基程度の短いDNA分子の $1 \text{ pmol} (= 10^{-12} \text{ mol})$ は、 $100 \mu\text{L}$ の緩衝溶液に容易に溶解し、その上、その分子数は約 $6 \times 10^{11}$ 個にもものぼる。従って、この膨大な数の分子が相互作用により解を表す分子を形成するならば、従来のコンピュータを用いて行う並列計算するよりも遙かに大きな並列数で解を求めることができる。また、 $1 \text{ mL}$ にも満たない溶液中でもこの反応は行えるため、加温冷却を行ってもエネルギーはほとんど消費されない。これらのDNAを使った計算機は、多変数の大きな問題に適用したときにノイマン型計算機の処理速度を凌駕すると予測される。しかしながら、現在のところ、実用化に耐え得る、効果的にDNA分子により分子計算を行える装置は開発されていない。

## 【0007】

また他方、種々の遺伝子解析方法が考案されてきた。特に、DNAマイクロアレイ (例えば特開平11-243999、特開2000-270896) は、強力な遺伝子解析の手段である。これらは、DNAのハイブリダイゼーション反応を利用するものである。例えば、DNAマイクロアレイは、検出する遺伝子に対して相補的な塩基配列を有するプローブDNAを、ガラス基板上に微小スポットで高密度に固定することにより製造される。このDNAマイクロアレイを用いて、正常細胞と異常細胞の遺伝子発現の差異を見たり、1塩基多型を見たりすることが試みられている。

## 【0008】

例えば、遺伝子型を決定する遺伝子座が複数有り、各遺伝子座の特定の塩基配列の組み合わせにより遺伝子型が複雑に変わる遺伝子がある。このような遺伝子の例としては、白血球の型、HLA (Human Leukocyte Ant

i g e n) 型がある。HLA型は、種類が多くその塩基置換の箇所も多いため、精密な型判定を行うには多数のDNAプローブを具備したDNAマイクロアレイを用いる必要がある。また更に、マイクロアレイの検出結果を解釈し、HLA型を判定するための工程は、電子計算機（例えば、一般的なコンピュータ等）を用いて算出したり、また判定表に照合して実行している。

#### 【0009】

例えば、従来技術では、複数の遺伝子座により決定される遺伝子型を決定する場合、検体を処理して得た核酸を、DNAマイクロアレイのような多種の核酸の存在を検出するようなデバイス、もしくは多穴プレートの複数のウェルを用いて検出し、それらの検出結果から電子計算機を用いて遺伝子型を判定していた。例えば、湧永製薬の発売しているHLAタイピング試薬では、遺伝子型ごとに分けた複数のウェルにて別々のハイブリダイゼーション反応を行い、それらのうち発色しているウェルを判定表に照合し遺伝子の型を判定する。このような方法では、少数の遺伝子型を多くの遺伝子座の塩基置換により判定する場合、多くの数のウェルを使用しなければならず無駄が多い。また、判定が複雑であるために、従来の半導体コンピュータ等の大型計算機を用いてクラスタ解析を行って判定を行いざるを得なかった。

#### 【0010】

##### 【発明が解決しようとする課題】

上記のような状況に鑑み、本発明は、従来の分子計算では人の手で行った作業を電子計算部で自動的に行い、分子計算機で実現が難しい機能、例えば、プログラムの入力や表示等を電子計算部で実現する核酸分子を用いた計算装置を提供することを課題とする。特に、NP完全問題等の困難な問題を解くために有利な超並列計算を高速に行う分子計算装置を提供することを課題とする。

#### 【0011】

また、本発明者らは、遺伝子解析を核酸分子を入力とした計算として捉えた。例えば、発現mRNAおよびゲノム上の遺伝子を符号化核酸のデータに変換することで、以降の計算で検索や、それらデータの論理和、論理積、否定を計算することで、遺伝子型判定や特定の疾患での遺伝子の発現条件を計算により求めるこ

とができる。このような発想を基に、遺伝子解析を計算としてプログラミングし計算結果を得る分子計算装置を提供することを課題とする。

## 【0012】

## 【課題を解決するための手段】

本発明は、電子計算部と分子計算部とを具備する分子計算装置であって、前記電子計算部が、実質的に分子計算部の機能を制御することを特徴とする分子計算装置である。

## 【0013】

## 【発明の実施の形態】

本発明の最も基本となる思想は、核酸分子を用いてデータ並列計算を行うことであり、具体的には、核酸分子を情報を担う媒体として機能させ、その核酸分子が担う情報を酵素やハイブリダイゼーション等の反応によって処理する情報処理方法である。ここで使用する「核酸分子」および「分子」とは、cDNA、ゲノムDNA、合成DNA、mRNA、全RNA、hnRNAおよび合成RNAを含む全てのDNA並びにRNAを意味する。従って、ここにおいて「核酸分子」と「分子」とは交換可能に使用される。

## 【0014】

例えば、分子生物学でよく使用される $100\mu\text{M}$ のDNAオリゴヌクレオチド溶液 $1\text{mL}$ 中には、 $6 \times 10^{16}$ のDNAオリゴヌクレオチド分子が存在する。1本のDNAオリゴヌクレオチド分子で1文字を表現したとすると60,000,000Gバイトの記憶容量になる。例えば、ひとつの命令を実行するのに $10^3$ 秒かかったとしても $6 \times 10^{16}$ のDNA分子で同時に命令が実行されれば、1秒当たり $6 \times 10^{13}$ の命令を実行したことになる。このように核酸分子による並列性は非常に高いものである。

## 【0015】

本発明の計算装置において基礎となる計算法は、このような分子演算の並列性を利用して、従来の電子コンピュータより高速に論理式を評価する方法である。本発明は、このような核酸分子を用いて計算を実施することによって、データの並列処理や遺伝子解析を有利に行う計算装置を開示する。核酸分子でデータやプ

プログラムを表現し、その分子反応で命令を実行することにより、従来の電子コンピュータに比べて桁違いに大きなメモリ容量と高い並列処理能力を実現することが可能である。

## 【 0 0 1 6 】

また、本計算装置を用いて遺伝子解析を行った場合、特定の配列を有する核酸を標的としてそれらの存在または不存在を評価することや、またそれによって、例えば、遺伝子型や遺伝子の発現の状態を決定することが、小さい実験誤差で、低コストで、且つ簡便に行うことが可能である。

## 【 0 0 1 7 】

以上の分子計算機の並列計算性を活かし、しかも従来の分子計算機で実現することが難しい機能を電子計算機により補完して実現し、操作者が分子計算のための実験計画や符号化分子の割り当て等を行う必要がなくなる。

## 【 0 0 1 8 】

## I. 発明の概要

## [分子計算装置]

本計算装置を開発するに当たり、まず最初に、本発明者らは、分子計算機を用いて演算を実行するときの計算プログラムの内容を、分子計算部で認識し且つ実行することが可能なデータ形式に変更しなければならないことに注目した。即ち、分子計算部で計算を実施する前に、分子を特定の符号に結びつけた符号分子に変換し、それを用て計算プログラム中の変数および定数などのデータを自動的に符号分子に変換しておくことが好ましいことを見出した。更に、このような変換操作は、電子計算部において行うことが計算速度の向上のために好ましいことを見出した。

## 【 0 0 1 9 】

従って、本発明の分子計算装置は、分子計算部と電子計算部とが互いに補完的に機能を分担する計算装置である。従って、使い勝手がよく、その上、速い速度でNP完全問題を解くことが可能である。即ち、本発明の計算装置は、分子計算部の欠点、即ち、文字の入力や表示、単純な四則計算が遅いという欠点を、電子計算部を用いてカバーすることによって速度向上を可能にした。従って、本発明

の分子計算装置は、電子計算機が高速に実現できる機能は電子計算部が担当し、それ以外の部分を分子計算部が担当するハイブリッド分子計算装置である。

#### 【 0 0 2 0 】

本発明の基本となる計算装置を図 1 に示す。本発明の計算装置は、電子計算部 1 1、電子計算部への入力部 1 および出力部 1 0、並びに分子計算部 1 2、分子計算部への入力部 8 および出力部 9 を具備する。更に、電子計算部 1 1 は、演算部 4、記憶部 3 および入出力制御部 2 を具備し、分子計算部 1 2 は、演算部 5、記憶部 6 および入出力制御部 7 を具備する。ただし、演算部 5 と記憶部 6 は実体としては分子や実験用部材であり演算とデータの記憶を同時に実現している。

#### 【 0 0 2 1 】

本発明の計算装置において、基本的に、電子計算部 1 1 は、該分子計算部 1 2 を制御する部分である。電子計算部 1 1 に所望するプログラムが入力されると、入力された情報を基に、分子計算部 1 2 において実行する分子計算の計画が作製され、また、目的とする分子計算に必要な分子の設計が行われ、それにより得られた情報を分子計算部 1 2 に伝え、分子計算部 1 2 における分子計算を行う。更に、分子計算部 1 2 において得られた計算の出力は、電子計算部 1 1 に戻り、所望の処理が施されてもよい。例えば、それらの結果は、予め入力し、記憶部 3 に記憶しておいた処理形式に応じた形式で集計および演算処理され、最終的に出力部 9 または出力部 1 0 に所望する形態で出力される。これらの処理の間、分子計算部の演算部や記憶部の状態は、電子計算部において入出力制御部を通じて間接的に把握されている。この様子を図 1 では点線で示している。

#### 【 0 0 2 2 】

一方、分子計算部 1 2 は、実験的に核酸分子を合成したり、合成された核酸分子を用いて所望する演算反応を行うことにより分子計算を実行する部分である。また、分子計算部 1 2 において行われる分子計算の例は後述する。

#### 【 0 0 2 3 】

電子計算部 1 1 の演算部 4 は、入力された初期値を符号分子表現に変換すること、計算プログラムの手続関数を対応する符号分子の演算反応に変換すること、および記憶された計算プログラムから演算反応の実行手順を作製すること等を行

う。また、電子計算部 1 1 にて制御されることは、例えば、分子の変数への割り当て、実験容器の割り当て、実験中の実験用部材（例えば、ピペットチップなど）や試薬の配置の割り当て、コンテナやピペッタなどの実験器具の移動や操作の割り当て、サーマルサイクラの温度制御の設定、並びに実験の実行シーケンスの決定などである。

#### 【 0 0 2 4 】

基本的な計算装置の処理を図 2 の処理フローに従って説明する。（S 1）所望する計算プログラムは、電子計算部 1 1 の入力部 1 から入力され、入力された計算プログラム、計算プログラムの定数および変数等の情報は記憶部 3 に記憶される。（S 2）演算部 4 において、記憶されたそれぞれの初期値は符号分子表現に変換され、前記計算プログラムの手続関数は対応する符号分子の演算反応に変換され、更に、記憶された計算プログラムから演算反応の実行手順が作製される。ここで、S 2 に含まれる工程をそれぞれの変換処理を「プログラムの翻訳」と称し、実行手順の製作を「実験計画の立案」とも称す。（S 3）続いて、演算部 4 において、S 2 の工程において得られた符号分子から実際に使用する核酸配列を設計する。この処理は、予め設計しておいた核酸配列を用いるならば行わなくてもよい。（S 4）以上の電子計算部 1 1 において得られた情報は、分子計算部 1 2 に送られ、S 3 において設計された各配列を有した核酸である符号分子が合成される。核酸の合成は演算部 5 において行われる。核酸合成に必要な材料は、入力部 8 から供給される。もし、予め設計し合成しておいた核酸を用いるならばこの合成は必要なく、入力部 8 から合成済みの核酸を入力する。（S 5）続いて、S 2 において得られた実行手順に従って、S 4 において準備された演算分子を用いて、プログラムに応じた演算反応を実行する。（S 6）S 5 において行われた演算反応により生じた反応産物を検出および同定を行うことにより、反応産物の解析を行う。（S 7）S 6 で得られた反応産物の情報は、電子計算部 1 1 に送られる。電子計算部 1 1 には、予め情報処理プログラムが記憶されているので、当該情報処理プログラムを呼び出し、それに従って分子計算部 1 2 から得た反応産物の情報を処理し、最終データを算出する。（S 8）予め記憶部 3 に記憶しておいた出力形式に合わせるように、S 7 において算出された最終データを処理し、

出力部 1 0 より出力する。

【 0 0 2 5 】

このような工程は、所望に応じて互いにループを形成することも可能である。例えば、各工程により得られた結果を、記憶部 3 に予め記憶された条件等と比較し、その比較結果によってはそれ以前の何れかの工程を単独で、または複数の工程を組み合わせて実施することを、繰り返して行うように設定することも可能である。

【 0 0 2 6 】

また、どうしても自動化が難しい場合や、自動化すると装置が大がかりになる場合、例えば、クローニングにおける培養やコロニーピッキングなど人力で行うことが好ましい実験操作を行うときには、一度出力部 9 に核酸を出力し、出力部 1 0 に行うべき実験操作を表示する。この後、人力による実験操作を行ってから再び入力部 8 に核酸を入力し、入力部 1 から再起動を入力する、または入力を自動的に検出することで計算を再び始めてもよい。

【 0 0 2 7 】

また、この工程において計算プログラムが所望の分子を得ることを目的とし、計算結果を表示する必要がない場合、S 5 で得られた所望の分子を最終出力とし、S 6 から S 7 を実行せず、S 8 で計算の終了を表示してもよい。例えば、特定の遺伝子の特異的に検出するオリゴ DNA を選択する計算を実行した場合などである。

【 0 0 2 8 】

S 2 の工程における符号分子への変換は、予め、記憶手段に記録しておいた分子変換テーブルを読み出し、そこに含まれるデータを検索して対応するデータを読み出すことにより行うことが可能である。例えば、分子変換テーブルは、分子計算に使用する符号分子と、電子計算部に入力する情報とを対応付けたものでよく、一般的に使用される対応表を電子データとしたものであればよい。

【 0 0 2 9 】

また、S 2 の工程における計算プログラムの手続関数の演算反応への変換は、予め、記憶手段に記録しておいた手順変換テーブルを読み出し、そこに含まれる

データを検索して対応するデータを読み出すことにより行うことが可能である。例えば、手順変換テーブルは、実際に行われる分子計算の工程、それを実施する順序および繰り返し回数等と、電子計算部に入力する情報とを対応付けたものでよく、一般的に使用される対応表を電子データとしたものであればよい。

## 【 0 0 3 0 】

また、以上の各工程で得られた情報は、工程毎に全て記憶部 3 に記憶されても、少なくとも一部分が記憶されてもよい。

## 【 0 0 3 1 】

本計算装置における電子計算部への入力部は、例えば、キーボードおよびマウス等の一般的に情報を入力することが可能な入力手段の何れかを使用することが可能である。本装置の電子計算部への出力部は、ディスプレイおよびプリンタ等の一般的に情報を出力することが可能な出力手段の何れかを使用することが可能である。

## 【 0 0 3 2 】

また、上述の手順では、分子計算部 1 2 に具にされる演算部 5 において、核酸分子の合成を行うように記載したが、分子計算部 1 2 および電子計算部 1 1 に内包されず、しかし電子計算部 1 1 と分子計算部 1 2 とに連結して存在するような分子合成部として配置することも可能である。また、分子計算部 1 2 における演算部 5 は、核酸分子を用いた演算反応を行うために必要な以下のような各部分を具備する。即ち、そこにおいて各種反応を行うための反応部、反応に必要な核酸を保持するための核酸保持部、反応に必要な試薬および緩衝液等を保持するための試薬保持部、反応に必要な酵素を保持するための酵素保持部、各部分を所望に応じて加熱するための加熱手段、各部分を所望に応じて冷却するための冷却手段、分注用ピペット等の分注手段、ピペットや反応容器等を洗浄するための洗浄手段、並びに各種操作を制御するための制御手段を全て、またはその中の幾つかを組み合わせて具備することが可能である。

## 【 0 0 3 3 】

また、演算部 5 は、目的の演算反応により生じる反応産物を検出および同定するための検出手段を具備してもよい。しかしながら、検出部は、演算部 5 に必ず



しも包含する必要はない。即ち、検出部は使用する検出手段によっては非常に大がかりな装置になる場合もあるので、電子計算部 1 1 および分子計算部 1 2 には内包されず、しかし電子計算部 1 1 と分子計算部 1 2 とに連結して存在するような検出部として配置することも可能である。

## 【 0 0 3 4 】

例えば、本装置における検出は、演算反応により生じた反応産物を電気泳動し、そのピークの位置を検出することによって核酸分子の長さを判定して実施してもよい。または、反応産物を DNA シーケンサに供し、そこから出てくるデータを基に配列を検出して実験最初に割り当てていた符号化核酸の何れであるのかを判断してもよい。或いは、DNA マイクロアレイとスキャナを装備することにより、符号化核酸の配列をハイブリダイゼーション法により読み取ることにより実施してもよい。

## 【 0 0 3 5 】

また、上述の処理フローでは、検出した結果は電気計算部 1 1 に送られて、出力部 1 0 より出力されたとしたが、上記したような分子計算部 1 2 における検出が行われた結果として得られる分子をそのまま生データとして得ることも可能である。

## 【 0 0 3 6 】

電子計算部 1 1 において、一連の実験の手順、即ち、実験シーケンスを計画するためには、入力されたプログラムと問題とその初期値とから、一意に実験シーケンスが定まることが必要である。例えば、3 SAT のプログラムの場合は、プログラムのループを展開し、条件分岐については問題を参照して予め判断しておくことによって、実験計画を定めることができる。従って、プログラムの計算が始まる時点で全ての実験計画を定めることができる。ただし、プログラムによってはループの途中に配列検出操作を入れて配列を確認してから条件分岐を行わなくてはならない場合もある。その場合、検出操作を行ってからその結果に応じて次の段階の実験計画を立てるように実行すればよい。

## 【 0 0 3 7 】

また、本発明の計算装置では、実験操作、例えば、cDNA の合成などを関数

化し、実験操作と関連づけて電子計算部に記憶させておくことが可能である。これにより自動的な手順の計画が可能となる。また、自動的に符号化反応を行うことにより、それぞれの処理、例えば、論理演算および／または配列検索を自動的に並列的に行うことができる。

## 【 0 0 3 8 】

本発明によれば、従来の実験用、臨床用および製造用等の種々の作業用ロボットシステムを、事前に準備された電子計算部側のプログラムに制約されることなく、目的を最優先とした作業計画に対応するように動作させることが可能となる。場合によって、ロボットシステムに最適な作業計画を自動的に組み立てるような設定も可能となる。

## 【 0 0 3 9 】

本発明における符号化配列として、例えば、ヒトの遺伝子を変換する場合には、ウイルスなど、異種で塩基配列のホモロジーが低い生物の部分配列を用いることが好ましい。また、単に 3 S A T などの非生物的な問題を解く場合には、クロスハイブリダイゼーションしないように、且つ  $T_m$  がほぼ等しいような配列を任意に設計し、符号化配列として使用することも可能である。また、数が多く必要であれば、電子計算部 1 1 において所望の条件を満たすように計算で求めた正規直交化配列を用いることがより好ましい。

## 【 0 0 4 0 】

また、分子を直接的な入力とした演算が可能になるので、例えば、遺伝子解析に本発明を利用した場合には、実験誤差を最小に抑えることが可能である。即ち、核酸を符号化核酸に変換して装置内で分子の状態のまま計算処理するので実験誤差が抑えられる。また、本発明の計算装置の使用により計算時間およびランニングコストが削減できる。更に、遺伝子解析をプログラミングにより表現することで、実験を自動的に計算して実行することもできる。また、発現遺伝子を符号化 O L A (Oligonucleotide Ligation Assay) を行うことにより符号化核酸に変換し、符号化核酸の 3' と 5' 末端にある共通配列により P C R 増幅すれば、正確にそれらの発現比を検出することができる。符号化 O L A についての詳細は後述する。

【0041】

II. 詳細な説明

1. 分子計算装置

以下に更に詳細に本発明を説明する。本発明の計算装置の例を図3に示す。図3に示した計算装置は、電子計算部と分子計算部と核酸合成装置からなり、これらは互いに連結されている。

【0042】

まず、電子計算部における処理手順の例を説明する。まず、入力部から入力された計算プログラムおよび初期値は記憶部に記憶される。或いは、記憶部に記憶される前に、翻訳・実験計画立案・実行部において、符号分子および符号分子の演算反応に変換され、且つ演算反応の実行手順が作製され、続いて記憶部に記憶される。次に、核酸配列計算部において、前述で得られた変換後の情報を基に演算分子が計算され設計される。これらの工程において扱われる情報は、常に結果出力部を経て表示部に表示されてもよく、或いは、所望する情報のみを随時表示されるように設定されてもよい。必要に応じてプリントアウトされてもよい。

【0043】

核酸配列計算部において得られた演算分子等の分子計算に必要な核酸は、電子計算部の処理により得られた情報を基に核酸合成装置によって合成される。合成された核酸は、分子計算部の核酸容器に運ばれる。

【0044】

一方、分子計算部および電子計算部には、電子計算部からの情報を受けたり、電子計算部へ情報を送るための通信部が具備される。通信部は、ケーブル等の有線の通信手段により達成されても、また、電波等の無線の通信手段によって達成されてもよい。

【0045】

分子計算部には、そこにおいて反応を行うためのサーモバス反応容器と、そこにおいてビーズを保持するビーズ容器と、同様に酵素を保持する酵素容器と、緩衝液を保持する緩衝液容器と、核酸を保持する核酸容器とを具備する。これらは、ビーカー、試験管若しくはマイクロチューブ等の容器でよく、または一般的に

使用される他の保持手段を用いることが可能である。

【0046】

サーモバス反応容器は、温度調節の可能な反応容器でよく、例えば、一般的に使用されるサーモバスに反応容器を具備させることにより構成することが可能である。また、この例では、担体としてビーズを用いた場合の例を示したが、他の担体を用いることも可能である。その場合、ビーズ容器に代えてまたはビーズ容器に加えて、適切な構成要素を具備することが可能である。また、酵素容器は、酵素を失活から守るためにクーラー等の温度調節手段と共に具備されてもよい。また、必要であれば他の保持手段にもクーラーまたはヒーター等の温度調節手段を配置してもよい。

【0047】

サーモバス反応容器における反応は、計算プログラムに沿って実施される。例えば、保持容器から所望する容量の内容物をXYZ制御ピペッタにより分取した後、所望する温度等の条件に従って反応が実施される。各部分における動きは、分子計算部内の自動制御部により制御される。自動制御部の動きは、電子計算部により制御される。ここで、XYZ制御ピペッタとは、自動制御部により制御されて、所望に応じてXYZ方向および／または上下に移動するピペッタをいう。

【0048】

反応終了後、検出部において反応産物の検出および同定が実施される。検出部は、電気泳動装置、シーケンサー、化学発光測光器および蛍光光度計等の一般的に核酸分子を検出および解析するために使用される何れの検出手段または解析手段を使用してもよい。

【0049】

本発明において、分子計算部は、ハイブリダイゼーション反応、酵素反応、抗原抗体反応のような生物学的特異反応の開始から終了までに関わる工程または手段を少なくとも含んでいるものとする。ここで、反応の開始時点は、早ければ反応対が有意に選択性を示すと認められる段階を少なくとも含み、遅くとも検出、分離等の目的が達成できる直前の時点を含んでいる。また、反応の終了時点は、早ければ検出、分離等の目的が達成できた最も早い時点を含み、遅く

れば検出、分離等の目的が十分に達成できる経過時間よりも長い時点を含むことができる。

#### 【0050】

図4に、本発明の分子計算部における各部の配置例を示す。例えば、分子計算部には、8本取りチップラック21、1本取りチップラック0番22、1本取りチップラック1番23、96穴マルチタイタープレート（以下、MTPと称す）2番24、96穴MTP0番25、1.5mLチューブラック26、96穴MTP1番27、サーマルサイクラー96穴MTP28およびチップ廃棄口29を配置することが可能である。しかしながら、これにより何ら制限されるものであり、所望に応じて各種変更が可能である。

#### 【0051】

### 2. 分子計算部における分子計算

最初に従来のエーデルマン-リプトンパラダイムに基づくDNA計算の問題点を説明する。エーデルマン-リプトンパラダイムに基づくDNA計算は、先ず、最初に全ての解の候補を表現するDNA分子のプールを生成する必要があることが問題である。NP完全問題の解の候補数は変数の数に対して指数関数的に増大するものである。従って、問題のサイズが大きくなると、超大容量メモリを備えたDNAコンピュータでも全ての解の候補を含む完全なプールを生成できない危険性が生じる。これが、エーデルマン-リプトンパラダイムが内包する深刻なスケール問題である。

#### 【0052】

例えば、代表的なNP完全問題である三和積形命題論理式の充足可能性問題（3SAT）を考えてみる。論理変数の数を100とすると、解の候補は $2^{100} = 1.3 \times 10^{30}$ にもなる。1変数を15塩基対のDNA分子で表現すると、完全なプローブを生成するためには少なくとも2万トンという非現実的な量のDNA分子が必要になる。1分子で一つの解の候補を表現したのでは計算反応の途中で失われてしまう危険性が高い。従って、実際にはより大量のDNA分子が必要である。変数の数が200になると、少なくとも地球の質量の約40兆倍ものDNA分子が必要となる。これでは実際に問題を解くことは不可能であると言わ

ざるを得ない。

【0053】

そのような状況において、発明者らは、ダイナミック・プログラミングに基付いたアルゴリズムをDNAコンピュータで実行することによりNP完全問題を解くことを考えた。即ち、エーデルマン—リプトンパラダイムのように最初から全ての解の候補を生成するのではなく、部分の問題の解の候補を生成してその中から解を選択抽出する。この操作を部分問題のサイズを逐次的に大きくしながら繰り返し、最終的に本来の問題の解を得るのである。このようにすれば、生成される解の候補の数を大幅に減らすことができる。

【0054】

(1) 分子計算部における計算；その1

そのような発想を基に、実際に本発明の装置の分子計算部において利用することが可能な分子計算の方法を以下に説明する。

【0055】

細胞で発現された遺伝子をcDNA化し、そこにおける発現遺伝子と非発現遺伝子を人工的に設計した配列をもつDNA分子に変換し、変換により得られたDNA分子を演算用核酸にハイブリダイゼーションすることにより演算解析を行う方法である。ここで、前記DNA分子は、特定の標的遺伝子が存在しているか否かの情報を担う一種の信号として機能する。

【0056】

また、標的遺伝子が存在することを確認することによって当該遺伝子が発現遺伝子であることが、また、標的遺伝子が存在しないことを確認することによって当該遺伝子が非発現遺伝子であることが解析できる。従って、本計算方法では、サンプル中に含まれる標的分子を検出することが可能であるばかりではなく、同様に、サンプル中に含まれない標的分子であってもそれが存在しないことを検出することが可能である。

【0057】

(1. 1) 準備

本計算方法には以下のような分子が必要である。従って、本計算に先駆けて、

以下の分子を調製する。当該調製はそれ自身公知の方法により行うことが可能である。

## 【0058】

溶液に含まれる cDNA を検出するために図 12 に示す 2 つのプローブ、即ち、点線で囲まれた  $a_i$  と  $A_i$  を準備する。 $a_i$  は、標的の cDNA の一部の配列に相補的な配列を含み且つ 5' 端にビオチンを標識したオリゴヌクレオチドである。 $A_i$  なるオリゴヌクレオチドは部分的にハイブリダイゼーションにより 2 本鎖になったオリゴヌクレオチドである。 $A_i$  を構成する 2 本鎖のうちの一方のオリゴヌクレオチドは、人工的に設計された SD、DCN<sub>i</sub> および ED なる塩基配列を 3' 端側に有し、標的の cDNA の一部分の配列に相補的であり且つ  $a_i$  分子の標的に相補的な配列に隣接するような配列を 5' 端側に有する。また、前記人工的に設計した塩基配列は、当該相補的な配列よりも 3' 末端側に配置される。また、 $A_i$  の標的 cDNA に相補的な配列の 5' 端はリン酸化されている。2 本鎖  $A_i$  を構成するもう 1 方の鎖は SD、DCN<sub>i</sub> および ED の配列に相補的な配列をもつオリゴヌクレオチドである。溶液中に  $a_i$  および  $A_i$  は、溶液中に存在するまたは存在しないことを検出したい標的遺伝子のそれぞれについて任意に設計する。またこのとき、DCN<sub>i</sub> の配列は標的ごとに異なる配列になるように設計し、SD および ED はすべての  $A_i$  で共通する配列になるように設計する。これらの人工的な配列は、任意に設計可能であるので、所望する  $T_m$  値を設定することが可能である。従って、安定に且つミスハイブリダイゼーションの少ない反応を行うことが可能である。

## 【0059】

また更に、図 16 に示すような 5' 端にビオチン標識をした SD 配列と同じ配列を有するプライマー 1 と、ED 配列に相補的な配列を有するプライマー 2 が必要である (図 16)。

## 【0060】

更に、図 19 に示すような「標的が存在すること」を示す DCN<sub>i</sub> に相補的な配列を有する存在オリゴヌクレオチド 33 (図 19) と、「標的が存在しないこと」を示す DCN<sub>i</sub><sup>\*</sup> に相補的な配列を有する不存在オリゴヌクレオチド 36 (

図 2 3) が必要である。

#### 【0061】

また、図 2 0 に示すような有無変換オリゴヌクレオチド 3 4 が必要である。これは、 $DCN_i$  に対応するように人工的に設計され且つ  $DCN_i$  とは異なる配列を有した塩基配列である  $DCN_i^*$  を 5' 端側に具備し、その 3' 端側に隣接して  $DCN_i$  配列を具備するオリゴヌクレオチド (図 2 0) である。

#### 【0062】

##### (1. 2) 存在分子と不存在分子への変換

本発明の方法では、まず、サンプル中に、特定の標的分子が存在しているという情報を「存在分子」に変換し、特定の標的分子がある系に存在していないという情報を「不存在分子」に変換する。ここで使用する「存在分子」と「存在オリゴヌクレオチド」の語は互いに交換可能に使用される。また「不存在分子」と「不存在オリゴヌクレオチド」も同様に交換可能に使用される。

#### 【0063】

このような分子の存在、不存在を分子表現に変換する方法について図 1 2 から図 2 3 を用いて説明する。図 1 2 から 2 3 は、それぞれの工程における系に存在する分子を模式的に示したものである。

#### 【0064】

図中、DNA を矢印により示し、矢印の元部を DNA の 5' 端とし先端を 3' 端とする。矢印の途中に入る該矢印への短い垂線は、塩基配列の区切りを示す部分である。また、図中の矢印の近くに示す、「a」、「A」および「DCN」等のアルファベットは配列の名前を示す。また、「a」、「A」および「DCN」等のアルファベットに付された添え字「i」および「k」は整数であり、それぞれの配列が、どの遺伝子に対応するかを表示するために付されたものであり、ここでは「i」および「k」により任意の配列を示す。また、ここでは便宜的に「i」は発現遺伝子を、「k」は非発現遺伝子を示す。また、図中、配列名の上に線が引かれている場合は、相補的な配列を示す。図中の斜線のある円はビオチン分子を示し、白い大きい円は磁気ビーズを現す。磁気ビーズから右横に伸びる黒い十字は、該磁気ビーズに固定されたビオチン分子と特異的に結合するストレプ



トアビジン分子を模式的に示している。

【0065】

a. 「標的が存在する」という情報の「存在分子」への変換

標的が存在する場合の存在分子への変換は図12から19に示す工程を逐次的に行うことにより実施される。

【0066】

まず、図12を参照されたい。上述の通り合成した  $a_i$  および  $A_i$  を、Taqライゲースのような高温で活性の高い酵素の反応バッファ中でcDNAと反応させる。但し、このライゲーション反応の温度は  $A_i$  オリゴヌクレオチドの2本鎖部分が解離しない温度とする。この反応の結果、標的が存在した場合は、図13のようにライゲースにより  $a_i$  と  $A_i$  は連結される。次に、この反応溶液から図14に示すようにストレプトアビジンを表面に結合した磁気ビーズにて前記連結オリゴヌクレオチドを抽出する。このとき、未反応の  $a_i$  分子もビーズに捕獲されるが、以後の反応には関係しない。

【0067】

続いて、熱をかけることで、磁気ビーズで捕獲した  $A_i$  と  $a_i$  の連結分子から  $A_i$  部分の相補鎖を分離抽出する（図15）。この操作によって、最初の溶液にcDNAが存在していれば、それに対応する  $DCN_i$  配列に相補的な配列を含んだオリゴヌクレオチドが抽出される（図15）。この抽出オリゴヌクレオチドをテンプレートとして、5' 端にビオチン標識をしたSD配列と同じプライマーと、ED配列に相補的なプライマーにて図16のようにPCR増幅反応を行う（図16）。これにより存在していると判明した遺伝子を検出する  $DCN_i$  配列が増幅される。

【0068】

このPCR増幅による2本鎖の産物を、図17に示すようにストレプトアビジン結合磁気ビーズにより捕獲する（図17）。捕獲した2本鎖のPCR産物を捕獲したままで熱をかけて1本鎖にし、解離させた相補鎖を緩衝液交換により除去する（図18）。続いて図19のように、 $DCN_i$  に相補的な配列をもつ存在オリゴヌクレオチドを、ビーズに捕獲されたPCR産物にハイブリダイズする（図

19)。このハイブリダイゼーションの後、過剰な存在オリゴヌクレオチドを除去し、続いて、改めて熱をかけることによってビーズに捕獲されている $DCN_i$ の相補鎖（即ち、存在オリゴヌクレオチド33）をバッファ中に抽出する。ここで抽出された $DCN_i$ に相補的な塩基配列を有する存在オリゴヌクレオチド33が、もとのcDNA溶液中に標的遺伝子が存在することを示す存在分子である。

## 【0069】

b. 「標的が存在しない」という情報の「不存在分子」への変換

上述の工程により、存在した標的遺伝子を、それが存在するという情報を示す存在分子（即ち、存在オリゴヌクレオチド）に変換した後で、存在しないという情報をこれを示す分子（即ち、不存在オリゴヌクレオチド）に変換する。標的が存在しない場合には、存在しなかったことを示す不存在オリゴヌクレオチドが抽出される。この抽出は以下の通りに実施される。

## 【0070】

予め、図20にあるような有無変換オリゴヌクレオチドを全ての検出対象の遺伝子の $DCN$ について準備する。上述した通り、有無変換オリゴヌクレオチドは、 $DCN_i$ に相対するために人工的に設計され、且つ $DCN_i$ とは異なる配列を有した塩基配列 $DCN_i^*$ を5'端側に具備し且つ3'端側に隣接して $DCN_i$ 配列を具えたオリゴヌクレオチドである。このような有無変換オリゴヌクレオチドと存在分子とのハイブリダイゼーション反応を利用することにより、「存在しない標的」を検出可能な「不在分子」に変換することが可能である。

## 【0071】

まず、図20に示す工程において、有無変換オリゴヌクレオチド35に対して、図8の過程で抽出した発現遺伝子に対応する $DCN_i$ の存在オリゴヌクレオチド33をハイブリダイズし、ポリメラーゼにより伸長反応を行う（図20）。その結果、発現遺伝子の $DCN_i$ は伸長し、 $DCN_i^*$ の配列の部分まで相補鎖が合成される（図20）。一方、図21の通り、標的分子が非発現遺伝子（ここでは $DCN_k$ と示す）であった場合、 $DCN_k$ に相補的なオリゴヌクレオチドは反応液中に存在しないため、有無変換オリゴヌクレオチド5は1本鎖のまま存在する（図21）。これら2本鎖と1本鎖の混合物は、ヒドロキシアパタイトを含

むカラムに通すことで1本鎖の有無変換オリゴヌクレオチドのみを抽出することができる(図22)。

#### 【0072】

このように抽出した非発現遺伝子に対応する $DCN_k$ をもつ有無変換オリゴヌクレオチドを、ストレプトアビジンと結合した磁気ビーズに捕獲する(図23)。次に、上述した存在オリゴヌクレオチド33のみの抽出と同様に、 $DCN_k^*$ に相補的なオリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーションし、過剰なオリゴヌクレオチドを除去して非発現遺伝子を示す $DCN_k^*$ にハイブリダイゼーションした不存在オリゴヌクレオチド36のみを抽出することができる(図23)。

#### 【0073】

不存在オリゴヌクレオチド36を得るための工程は以下のようにも実施できる。即ち、 $DCN_i$ オリゴヌクレオチドの5'端にFITCなどの蛍光分子を標識しておき、 $DCN_i$ に相補的な配列を有するプローブを含むDNAマイクロアレイにおいてハイブリダイゼーション反応を行う。これをスキャナなどで読み取り、どの $DCN_i$ が存在するかを検出する。このとき同時に、これにより存在していない $DCN_k$ もわかるので、これらのデータから、次の演算のために $DCN_k^*$ なる不存在オリゴヌクレオチド36を準備する。以上により存在しない核酸をその核酸に対応する不存在を示す核酸に変換することが達成される。これにより演算用核酸上での論理演算が可能になる。

#### 【0074】

また、この不存在オリゴヌクレオチド36を作る工程において、1本鎖の有無変換オリゴヌクレオチド36を鋳型として不存在オリゴヌクレオチド6を増幅してもよい。増幅は、例えば、図28から32に示される各工程を経て実施することが可能である。ここで、図28から32は、それぞれの工程を示すものであり、且つ各系に存在する分子を模式的に示したものである。各図中に示される記号等の詳細は上述した通りである。まず、図22の工程に従って、抽出された1本鎖のままの有無変換オリゴヌクレオチド35を得る(図22)。この有無変換オリゴヌクレオチド35に対して、図28に示すような、3'端側でSDに相補的な配列と、且つ5'端側でED配列に相補的な配列と結合した $DCN_k^*$ に相補

的な配列を有したオリゴヌクレオチド7をハイブリダイゼーションすることで不  
存在オリゴヌクレオチド36を抽出する。続いて、図29から32に示すような  
工程により、存在オリゴヌクレオチド33と同様に増幅した $DCN_k^*$ を得るこ  
とができる。即ち、図29に示す工程で、図28の工程において得たオリゴヌク  
レオチド37に対してビオチン標識したSD配列を有するプライマー31と、E  
D配列に相補的な配列を有するプライマー32を用いてPCR増幅する（図29  
）。次に、PCR産物をビオチンをストレプトアビジン分子に結合することによ  
り回収する（図30）。続いて、熱変性により、PCR産物を1本鎖にする（図  
31）。続いて、 $DCN_k^*$ に相補的な配列をもつ不存在オリゴヌクレオチドを  
、ビーズに捕獲されたPCR産物にハイブリダイズする（図19）。このハイブ  
リダイゼーションの後、過剰な存在オリゴヌクレオチドを除去し、続いて、改め  
て熱をかけることによってビーズに捕獲されている $DCN_k^*$ の相補鎖（即ち、  
不存在オリゴヌクレオチド36）をバッファ中に抽出する。ここで抽出された $D$   
 $CN_k^*$ に相補的な塩基配列を有する不存在オリゴヌクレオチド36が、即ち、  
もとのcDNA溶液中に標的遺伝子が存在しないことを示す不存在分子である。

## 【0075】

## （1.3）演算工程

演算工程では、上述で得られた存在分子および不存在分子と、以下に説明する  
演算用核酸とのハイブリダイゼーションおよび相補鎖合成とを行うことにより、  
所望する条件を現す演算式を解き、該条件を満たす解を求める並列計算を行う。

## 【0076】

演算の例として演算式として式1を用いる。ある特定の配列 $DCN_1$ 、 $DCN_2$ 、 $DCN_3$ および $DCN_4$ を標的配列とし、その有無の条件について論理式と  
して示した式1を、演算用核酸と存在分子および不存在分子とのハイブリダイゼ  
ーション反応と伸長によって演算して値を評価する。式1は、 $DCN_1$ 、 $DCN_2$ 、 $DCN_3$ および $DCN_4$ についての所望する有無についての組合せを条件と  
して示している。即ち、本例では式1の解を求めるということは、あるサンプル  
中における複数の標的配列の有無を同時に評価することである。

## 【0077】

【数 1】

式 1

$$(DCN_1 \wedge \neg DCN_2) \vee (\neg DCN_3 \wedge DCN_4)$$

式中、「 $\neg$ 」は「否定」、「 $\wedge$ 」は「論理積」、  
「 $\vee$ 」は「論理和」を表す記号である。

演算用核酸に設定した条件を満たす場合は、当該式の値は「1」、即ち「真」となる。また、演算用核酸に設定した条件が満たされない場合は、当該式の値は「0」、即ち「偽」となる。また本発明は、基本的な排他的論理和を達成している。従って、この組合せを用いればブール代数の全ての論理演算を実現できることが可能である

図 24 に示すのが演算用核酸 38 の配列構造である。演算用核酸は 1 本鎖のオリゴヌクレオチドであり、図では矢印で示している。矢印の向きは 5' 端から 3' 端に向かっている。5' 端にはビオチン分子が付いている。演算用核酸は複数のユニットを含む。その塩基配列は、5' 端から順に、マーカー分子が結合する  $M_1$ 、 $DCN_1$  が存在しないときに得られるオリゴヌクレオチドを検出する配列  $DCN_1^*$ 、 $DCN_2$ 、ポリメラーゼによる相補鎖伸長が止まるような配列を具えたストッパ配列 S、2 つ目のマーカーが付く  $M_2$ 、 $DCN_3$ 、 $DCN_4^*$  である。この演算用核酸の配列は、論理式の各項の並びにほぼ対応する。論理式の「否定」もそのままの配列となる。例えば、「 $DCN_4$ 」配列の存在が「否定」される場合には、「 $DCN_4^*$ 」の配列を用いる。ここで、 $DCN_4^*$  は上述した通りの  $DCN_4$  の対応するように設計された人工的な配列である。また、「論理和」記号は S 配列に置き換えればよい。「論理積」は演算用核酸上の配列として置き換える必要はない。式 1 のための演算用核酸の演算は、表 1 の各条件を満たすときに、その値が 1 になる。表 1 中「—」はどのような状態でもよいことを示す。

【0078】

【表 1】

DCN <sub>1</sub>	DCN <sub>2</sub>	DCN <sub>3</sub>	DCN <sub>4</sub>	式の値
発現	非発現	—	—	1
—	—	非発現	発現	1

## 【0079】

以下、論理式を評価する核酸反応について、その工程を説明する。演算工程は図25から27の工程を含み、演算反応は次の手順で行う。先に述べた論理式の演算を行うときには、図24に挙げた配列を具備した演算用核酸を準備する。1つのチューブに対して1種類の演算用核酸を入れ、それに先の工程で得た存在オリゴヌクレオチドと不存在オリゴヌクレオチドを含む溶液を入れ、ハイブリダイゼーション反応を行う（図25）。ここで、仮に、DCN<sub>1</sub>、DCN<sub>3</sub>、DCN<sub>4</sub>が存在し、DCN<sub>2</sub>が存在しないならば、演算用核酸にハイブリダイゼーションするのはDCN<sub>3</sub>のみである（図25）。また、ハイブリダイゼーション反応後、Taqポリメラーゼなど高温でも活性のある酵素により、ミスハイブリダイゼーションがおきない条件下で伸長反応を行うと、図26のようにM<sub>2</sub>配列部分は2本鎖となりS配列で伸長が止まる（図26）。

## 【0080】

次に、ストレプトアビジン磁気ビーズにより反応が終了した演算用核酸を捕獲する（図27）。最後に、検出反応としてマーカーオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション反応を行う（図27）。図27では、担体上に固定された演算用核酸を示しており、その5'端のビオチン分子は担体上にあるストレプトアビジン分子に結合している。さらにマーカー検出配列に相補的な配列をもつマーカーオリゴヌクレオチドM<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>を準備する。これらマーカーオリゴヌクレオチドの5'端には蛍光を発する分子が付いている。この例では、演算用核酸のM<sub>1</sub>配列は2本鎖化されていないので当該マーカーは演算用核酸に結合することが可能である（図27）。このあと、結合していないマーカーを除去してビーズを蛍光観察すれば、マーカーオリゴヌクレオチドM<sub>1</sub>がハイブリダイゼーションして

蛍光を発するため演算結果得られる論理式の値は「1」であることが分かる。

#### 【0081】

上述では、S配列をストッパーとして使用したが、S配列を必ずしも配置する必要はなく、その代わりとしてS配列をなくし、演算用核酸をS配列の両側にそれぞれ分けてもよく、または相補鎖が形成されないように人工的な塩基を具えたヌクレオチドを含ませてもよい。或いは、他の配列部分にシトシン塩基が含まれないように設計し、S配列の塩基配列にシトシン塩基が含まれるように設計することによっても、同様の効果が得られる。この場合、後述の図26に示す演算用核酸上での伸長反応の際にモノマーとしてdGTPを別途加えなければ伸長反応はS配列上で停止する。また或いは、ポリメラーゼが伸長反応を停止し易いグアニンやシトシンの連続した塩基配列としてもストッパーとしての目的を達成できる。或いは、S配列に相補的なPNAを演算用核酸にハイブリダイゼーションさせておけば、DNAとDNAのハイブリッドよりも、DNAとPNAのハイブリッドは安定であるため、5' エクソヌクレアーゼ活性のあるポリメラーゼであっても除去することなどできないのでS配列がストッパーとして機能する。

#### 【0082】

また、マーカーオリゴヌクレオチドの蛍光標識の種類を増やしてもよい。現在は、数多くの蛍光色素が開発されており異なる核酸に異なる蛍光色素を標識することが可能である。そのようにすれば、同時に多くの演算用核酸を標識することができる。例えば、この実施の形態において、 $M_1$  マーカーオリゴヌクレオチドと $M_2$  マーカーオリゴヌクレオチドとの間で蛍光分子を変えれば、検出した際に論理式の括弧で囲まれたどちらの条件が充足されたのかが判明する。また、演算用核酸毎にマーカー配列を変え、マーカーオリゴヌクレオチドに標識する蛍光分子も変えれば、1つのチューブに複数種類の演算用核酸を入れて同時に演算反応をすることができる。更にまた、蛍光強度は演算核酸の表現する論理式の充足度に比例するので、その大きさを知ることにも可能である。

#### 【0083】

また、演算結果を得るに当たって、次のようなこともできる。即ち、この実施の形態における存在オリゴヌクレオチドと不存在オリゴヌクレオチドを増幅する

工程において、PCR反応を増幅が飽和するように十分なサイクル数行えば、「存在」を「1」、「不存在」を「0」とする2値の論理演算が可能である。一方、PCR反応を増幅を飽和させず、元のcDNAの存在量に比例した量だけ得られるようにサイクル数を抑えれば、論理式を区間[0, 1]で確率的に評価することができる。例えば、発現遺伝子の場合は発現量に応じた結果が得られ、ゲノム配列であれば、ヘテロ接合かホモ接合かの違いを演算結果で知ることができる。

#### 【0084】

さらに演算用核酸をDNAマイクロアレイのように、基板上に微小スポット状に固定し、その場所と演算用核酸の論理式が対応するようにアドレッシングしてもよい。このようにしたときはマーカーオリゴヌクレオチドには蛍光標識をしておくのが好ましい。先に述べた演算反応をマイクロアレイ上の演算用核酸で行うと、DNAマイクロアレイの読みとり用スキャナで演算結果を読みとることができる。

#### 【0085】

また、このマーカーオリゴヌクレオチドにビオチン分子を標識していてもよい。このとき、演算用核酸の5'端にはビオチンを付けず、3'端、5'端にクローニングのための制限酵素認識配列を含むものにする。さらに反応においては図27に示すような演算用核酸をストレプトアビジン磁気ビーズにより捕獲する工程を行わない。この場合の検出反応はマーカーオリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーション反応した後で、ストレプトアビジン磁気ビーズによって演算用核酸をハイブリダイズしたマーカーオリゴヌクレオチドもそうでないものも両方とも捕獲し、捕獲した演算用核酸をクローニングし、シーケンサーで塩基配列を読み取る。それにより演算結果が「1」となる演算用核酸を確認することができる。このようにすれば1つのチューブに複数種の演算用核酸を入れて反応を行うことができる。

#### 【0086】

ここでは、4つの標的配列を用いた例を用いたが、更に多くの標的配列を対象とすることも可能である。また、ここでは、ビオチンとストレプトアビジンを回



収を行うためのタグとして使用したが、これに限られるものではなく、タグとこれに対して高親和性を有するものであればどのような物質を使用してもよい。

## 【0087】

また、DCN配列として正規直交化配列を用いてもよい。「正規直交化配列」とは人工的に設計した塩基配列であって、「正規」とは融解温度( $T_m$ )が揃っていることを示し、「直交化」とはミスハイブリダイゼーションが起きず、自己分子内で安定な構造をとらないということを意味する。

## 【0088】

これらの配列は電子計算部において計算によって求めることが可能である。即ち、このような計算は、電子計算部12の演算部または核酸配列計算部において行うことが可能である。

## 【0089】

例えば、15塩基の正規直交化配列を求めるには、任意の5塩基をランダムに生成する。これら短い塩基配列を「タプル」と呼ぶことにする。5塩基長のタプルは $4^5 = 1024$ 種類ある。これらタプルの中から3つを選んで連結し15塩基を構成する。この連結に用いたタプルに相補的なタプルは以降の連結には用いない。ここで、これらを連結した15塩基の配列の $T_m$ が $\pm 3^\circ\text{C}$ 以内に揃うような15塩基のセットを作る。また、自己分子内で安定な構造を取るかどうかを計算し、安定な構造をなすならばそのような15塩基は排除する。

## 【0090】

最後に全ての配列同士で互いに安定な2本鎖を形成しないかを検証する。以上の方法で生成した15塩基の配列は反応温度を適切に選べば互いにハイブリッドを形成せず、混在しても独立したハイブリダイゼーション反応をするのでより好ましい。これら正規直交化配列を特定の遺伝子塩基配列と対応関係を持つように核酸 $a_i$ と $A_i$ の配列を選び第1の実施の形態に従って反応を行えば、反応条件がより簡単になり、しかもより正確な演算反応を行うことが可能である。

## 【0091】

ここで、(1.1)準備の項目において記載した分子の設計は、計算プログラムから、電子計算部の翻訳・実験計画立案・実行部において必要な情報に変換され

た後に、核酸配列計算部において所望する条件に適切な核酸配列が設計される。  
また、前記の工程は、電子計算部の演算部において行うことも可能である。電子計算部において得られた情報に基付いて核酸が合成され、分子計算部において分子計算が実行される。

【0092】

(2) プログラム

N P 完全問題の代表例である 3 S A T は、例えば、次のようなプログラムに従って DNA 計算を実行することにより、ダイナミックプログラミングのアルゴリズムに基付いて解くことができる。

【0093】

【数 2】

**Problem :** 4 variables, 10 clauses

$$\begin{aligned} & (x_1 \vee x_2 \vee \neg x_3) \wedge (x_1 \vee \neg x_2 \vee \neg x_3) \wedge (\neg x_1 \vee x_2 \vee x_3) \wedge (\neg x_1 \vee \neg x_2 \vee x_3) \wedge \\ & (x_1 \vee x_3 \vee x_4) \wedge (\neg x_1 \vee x_2 \vee x_4) \wedge (\neg x_1 \vee \neg x_3 \vee x_4) \wedge (x_2 \vee \neg x_3 \vee \neg x_4) \wedge \\ & (x_2 \vee x_3 \vee \neg x_4) \wedge (\neg x_2 \vee x_3 \vee \neg x_4) \end{aligned}$$

ここで、記号の「 $\wedge$ 」は論理積、「 $\vee$ 」は論理和、「 $\neg$ 」は否定を表す。

【0094】

【数 3】

**Solution :**

YES

$$\{x_1, x_2, x_3, x_4\} = \{1, 1, 1, 1\}$$

【0095】

本装置を用いて 4 変数 10 節の 3 S A T 問題を解いた。解いた問題を数 2 に、問題の答を数 3 に示す。数 2 の問題の論理式は  $x_1$ 、 $x_2$ 、 $x_3$ 、 $x_4$  の 4 つの変数からなり、3 ラテラルの節が 10 個、論理積で結合されている。この式を満たす変数の値の組、すなわち解が有るかどうか、有るならばその変数の値の組を求めるのが目的である。

【0096】

## 【数 4】

```

function dna3sat ( $u_1, v_1, w_1, u_2, v_2, w_2, u_3, v_3, w_3, \dots, u_{10}, v_{10}, w_{10}$ )
begin
   $T_2 = \{X_1^T X_2^T, X_1^F X_2^T, X_1^T X_2^F, X_1^F X_2^F\}$ ;
  for  $k = 3$  to 4 do
    amplify ( $T_{k-1}, T_w^T, T_w^F$ );
    for  $j = 1$  to 10 do
      if  $w_j = x_k$  then
         $T_w^F = \text{getuvsat}(T_w^F, u_j, v_j)$ ;
      end
      if  $w_j = \neg x_k$  then
         $T_w^T = \text{getuvsat}(T_w^T, u_j, v_j)$ ;
      end
    end
     $T^T = \text{append}(T_w^T, X_k^T, X_{k-1}^{T/F})$ ;  $T^F = \text{append}(T_w^F, X_k^F, X_{k-1}^{T/F})$ ;
     $T_k = \text{merge}(T^T, T^F)$ ;
  end
  return detect ( $T_4$ );
end

function getuvsat ( $T, u, v$ )
begin
   $T_u^T = \text{get}(T, +X_u^T)$ ;  $T_u^F = \text{get}(T, -X_u^T)$ ;
   $T_u^F = \text{get}(T_u^F, +X_u^F)$ ; /* can be omitted */
   $T_v^T = \text{get}(T_u^F, +X_v^T)$ ;
   $T^T = \text{merge}(T_u^T, T_v^T)$ ;
  return  $T^T$ ;
end

```

## 【0097】

この問題を解くために数4に示す関数を本装置で実行する。記述法はパスカルに準じている。関数dna3satが問題を与えたときに解が存在した場合に解を出力するメイン関数である。この中にはgetuvsat関数が組み込まれている。これらdna3satとgetuvsatはamplify、appen

d、merge、detectの4つの基本関数で構成されている。それぞれの関数は図5から図8に示すDNAの反応により実行される。

#### 【0098】

次に各基本関数の反応を説明する。最初に、図5に従ってget (T, +s)、get (T, -s) 関数について述べる。get 関数は、オリゴヌクレオチドの混合溶液T (tube) から、sなる配列を含む1本鎖のオリゴヌクレオチドまたは該配列を含まないオリゴヌクレオチドを取得する関数である。ここで、sとは数塩基または数十塩基の特定の配列を示している。get (T, +s) はs配列を含むオリゴヌクレオチドを、get (T, -s) はsを含まないものを取得する。最初、sに相補的な配列を持ち5' 端ビオチンを標識したオリゴヌクレオチドをTに入れ、s配列を備えたオリゴヌクレオチドとアニーリングさせる。

#### 【0099】

ここでできたハイブリッドを、例えば、ストレプトアビジンを表面に結合した磁気ビーズで捕獲する。このあとs配列に相補的なオリゴヌクレオチドのなすハイブリッドが解離しない温度で磁気ビーズの緩衝溶液で洗えば（即ち、コールドウォッシュ；cold washすれば）、s配列を持たないオリゴヌクレオチドを緩衝液から取得でき、get (T, -s) が実行できる。

#### 【0100】

また、前記コールドウォッシュが終わってから、ハイブリッドが解離するような比較的高温の緩衝溶液で磁気ビーズを洗えば、その緩衝溶液からs配列を持つオリゴヌクレオチドを取得でき、get (T, +s) が実行できる。即ち、1つの操作で2つの関数を実行できるのである。

#### 【0101】

次に、図6に従ってappend (T, s, e) 関数の反応について述べる。これはオリゴヌクレオチドの混合液Tの中でe配列をその3' 端に備えた1本鎖DNAの3' 端にsなる配列を備えたオリゴヌクレオチドをライゲーションにより連結し、そのs配列を連結された1本鎖のオリゴヌクレオチドを取得する関数である。ここで、s、eとは先に述べたのと同様に数塩基若しくは数十塩基の特定の配列を指す。この反応では、次のオリゴヌクレオチドを用いる。s配列のオ

リゴヌクレオチドは、この5' 端がリン酸化されている。また、連結オリゴヌクレオチドは、5' 端にビオチン標識されており、5' 端側の s に相補的な配列と3' 端側の e に相補的な配列とを隣接して含有する。これらをチューブ T に入れて反応を始めると連結オリゴヌクレオチドは、T 中の標的オリゴヌクレオチド配列 e と s 配列オリゴヌクレオチドとでハイブリッドを形成する。このハイブリダイゼーション反応は、ミスマッチのハイブリッドが形成されないように比較的高温で行い、Taq ライゲースなど高温で活性の高い酵素を用いて連結される。このあとストレプトアビジン磁気ビーズなどによりハイブリッドを捕獲し、ハイブリッドが解離するような高温で洗えば（即ち、ホットウォッシュ）、3' 末端に s 配列が連結されたオリゴヌクレオチドを回収することができる。

#### 【0102】

次に図7に従って、 $\text{amplify}(T, T_1, \dots, T_n)$  関数の反応について述べる。これは反応溶液 T に含まれるオリゴヌクレオチドを PCR 反応により増幅し、増幅され二本鎖になったオリゴヌクレオチドを一本鎖に変えてから、 $T_1, \dots, T_n$  なる  $n$  個の反応溶液に分割する反応である。本実施例では T に含まれるオリゴヌクレオチドの両端には共通な増幅用の配列が具備され、1組のプライマーにより全ての T 中のオリゴヌクレオチドを増幅できるようにしている。プライマーのうち、増幅対象のオリゴヌクレオチドの3' 端に相補的な配列をもつものの5' 端にはビオチン標識が施されている。T のオリゴヌクレオチドをこの共通プライマーにより増幅し、ストレプトアビジン磁気ビーズにより捕獲する。これを94℃などの高温で全ての2本鎖が解離するように洗浄すれば、もともと T に含まれていた側の鎖が緩衝溶液中に抽出できる。この抽出溶液を均等に  $T_1, \dots, T_n$  の  $n$  個の反応溶液に分割すればよい。

#### 【0103】

次に  $\text{merge}$  関数は、引数の複数の溶液を1つの溶液に纏める操作を現す。

#### 【0104】

最後に  $\text{detect}$  関数を図8に従って説明する。検出は、手動による反応で実施することも可能である。 $\text{detect}$  関数を本装置により行う方法の例を以下に示す。ここでは  $\text{graduated PCR}$  なる、エーデルマンの論文 (Sci

ence, 266, 1021-4) において開示された検出手段を用いて行う例を示す。

【0105】

図8において、本装置で生成される解を示す核酸分子は、5' 端から順に4つの変数が真（即ち、T、true）または偽（即ち、F、false）を表す配列が連結した配列を有す。この解の配列は、同じく図8に示す全ての可能な解を検出できるようなプライマーにより個別にPCR増幅する。図中、配列名の上に引いた横線は、相補配列を示す。仮に、図8の最初に示すような配列の解が得られていると、図8の最後に示すプライマーの組で、且つ図示した長さのPCR産物が得られる。これら産物の存在と長さをゲル電気泳動にて確認すれば、PCR産物の得られたプライマーから解の配列が明らかになる。

【0106】

以上の関数を表2に纏めた。

【0107】

【表 2】

`get (T, +s), get (T, -s)`

試験管  $T$  の中から部分配列  $s$  を含む（含まない）DNA 分子を取り出す。

`append (T, s, e)`

試験管  $T$  の中にある末端条件  $e$  を満たす DNA 分子の端に配列  $s$  を付加する。

`merge (T1, T2, ..., Tn)`

試験管  $T_1, T_2, \dots, T_n$  の中にある DNA 分子を一緒にする。

`amplify(T, T1, T2, ..., Tn)`

試験管  $T$  の中にある DNA 分子を試験管  $T_1, T_2, \dots, T_n$  に（濃度を変えないで）分注する。

`detect(T)`

試験管  $T$  の中にある DNA 分子を検出する。

#### 【0108】

上述の数 4 に示すプログラムの主たる関数は `dna3sat` である。その中に先に述べた基本関数と、基本関数からなる `getuvsat` 関数が組み込まれている。最初にプログラム上の変数名の説明を行う。T とはチューブ (tube) の略であり、 $T_2$  とは  $x_1, x_2$  の 2 変数の取りうる全ての真偽の組 4 つを表すオリゴヌクレオチドを含む溶液である。 $X_1^T$  とは、変数  $x_1$  の値が真であることを示すオリゴヌクレオチドで長さは 22 塩基である。 $X_2^F$  とは、変数  $x_2$  の値が偽であることを示すオリゴヌクレオチドであり、長さは同じく 22 塩基である。

よって $T_2$ に含まれるオリゴヌクレオチドの1つ、 $X_1^T X_2^F$ は44塩基の長さの、 $x_1 = 1$ 、 $x_2 = 0$ なる割り当てを表す1本鎖のオリゴヌクレオチドだる。 $j$ 、 $k$ はループの進行状態を表す整数で、 $j$ は問題の論理式の何節目を計算しているかを示し、 $k$ は何番目の変数を計算しているかを表す。 $u$ 、 $v$ 、 $w$ は問題の論理式の各節内のひとつひとつのリテラルを示す。各リテラルは、数2の問題であれば、 $u_1 = x_1$ 、 $v_2 = x_2$ 、 $w_1 = \neg x_3$ となる。配列名 $X$ の上にあるバーは相補配列を意味する。また、 $X$ の右肩の $T/F$ は $T$ および $F$ を指し、 $X^T$ と $X^F$ を意味する。

【0109】

プログラムの順を追って説明する。実際にはプログラム解釈部がこのプログラムの関数および条件分岐、`for`ループを一連の実験操作に展開して実験計画を立てる。最初に問題の理論式はプログラムでの処理を容易にするために、各節で変数の添え字の昇順にリテラルを並べ替えておく。また、2変数 $x_1$ 、 $x_2$ に可能な割り当てを全て行った溶液 $T_2$ を準備しておく。

【0110】

関す`dna3sat`において、最初の`for`ループの $k = 3$ 、即ち、 $x_3$ に割り当てる値を決定するループについて説明する。最初に`amplify`関数で $T_2$ を増幅する。この場合、増幅後、 $T_2$ と同じオリゴヌクレオチドを持つ $T_w^T$ 、 $T_w^F$ に分注し、計3本の溶液チューブを得る。次に $k$ のループ内の $j$ の`for`ループに入る。ここでは、論理式の第 $j$ 番目の節の充足性を評価する。第1の条件分岐で、 $j = 1$ では第1節の第3リテラル $w_1$ が $x_3$ と等しいかを調べる。これは、電子計算部で予め論理式を調べ、`then`以降を実行するかどうかを判断し、実験計画に入れるかを決定しておく。ループ内第2の条件分岐で第1節の第3リテラル $w_1$ が $\neg x_3$ であるので`then`以降を実行する。

【0111】

`getuvsat`は下段に別に定義されており、それぞれの引数、 $T$ に対しては最初に`amplify`で生成した $T_w^T$ チューブ（内容および濃度は $T_2$ と同じ）、 $u$ に対しては $u_1 (= x_1)$ 、 $v$ に対しては $v_1 (= x_2)$ を入力する。最初の $T_u^T$ は $T_w^T$ の中から $X_1^T$ を含むオリゴヌクレオチドを抽出して溶液



を生成する。これにより、 $T_u^T$ は $\{x_1^T X_2^T, X_1^T X_2^F\}$ という内容になる。次に $T_u^F$ は $T_w^T$ の中から $X_1^T$ を含まないオリゴヌクレオチドを抽出して溶液を生成する。これにより $T_u^F$ は $\{x_1^F X_2^T, X_1^F X_2^F\}$ という内容になる。3つ目に $T_u^F$ は、 $T_u^F$ の中から $X_1^F$ を含むオリゴヌクレオチドを抽出して溶液を生成する。これにより $T_u^F = \{x_1^F X_2^T, X_1^F X_2^F\}$ という内容になる。ここでのこの行は無視可能というコメントがあるが、生成される溶液の内容を見れば明白である。実験上エラーが生じることのないように加えた行であるので、念のための実行する。無視した場合は、前行の $T_u^F$ を $T_u^F$ と読み替える。4番目の $T_v^T$ は $T_u^F$ の中から $X_2^T$ を含むオリゴヌクレオチドを抽出して溶液を生成する。これにより、 $T_v^T = \{x_1^F X_2^T\}$ という内容になる。最後にmerge関数により、 $T_u^T$ と $T_v^T$ が混合されて $T^T$ が生成され、returnにより出力される。 $T^T$ は $\{x_1^T X_2^T, X_1^T X_2^F, x_1^F X_2^T\}$ となりもとのdna3sat関数では溶液 $T_w^T$ と名を代えて扱うことになる。 $T^T$ の内容は第1節の第1、第2のリテラルが $x_1 \vee x_2$ なる形であるので、第2リテラル $\neg x_3$ がいかなる値であろうとも第1節の第1節が真である $x_1, x_2$ への値の割り当ての組を示している。以上により、getuvsat関数は既に2つのリテラルに値が割り当てられている節について、3つ目のリテラルの変数に何を割り当ててもその節が真であるような割り当てを表すオリゴヌクレオチドを選別する関数である。

【0112】

次に、再びdna3sat内の $k=3$ ループで $j$ を1つ増加させ、 $j=2$ で、第2節の計算に移る。この節では第3リテラルは第1節と同様に $\neg x_3$ なので条件分岐に効いてくるのは下段のif文である。第1節と同様にgetuvsatを実行する。注意すべきは先に行った $j=1$ で $T_w^T$ を生成していることである。また、 $v_2$ は $v_2 = \neg x_2$ なる否定が入ったリテラルなので、getuvsat関数の $T_v^T$ を求める式において $X_v^T$ は、 $X_2^F$ と読み替えてget関数を実行する。こうすれば、 $j=2$ で新たに得られる $T_w^T$ は、 $\{x_1^T X_2^T, X_1^T X_2^F\}$ となる。

【0113】

以降、順に  $j = 10$  まで実行する。途中、例えば、5 節目以降のように 3 番目のリテラルが  $k = 4$  である場合は、 $j$  の値をインクリメントし、ループの次の処理を行う。 $k = 3$  で 10 節分のループが終了すれば、 $T_w^T$  の中の 3' 末端が  $X_2$  のオリゴヌクレオチドに真を表す  $X_3^T$  を `append` する。また、 $T_w^F$  中の 3' 末端が  $X_2$  のオリゴヌクレオチドに偽を表す  $X_3^F$  を `append` する。このあと `append` 後の溶液を `merge` し、 $k = 4$  のループに移る。 $k = 4$  のループが終了すれば、最終的にループを脱し、 $T_4$  チューブを `detect` 関数で処理する。

## 【0114】

以上のように計算を実行するので、変数の数を  $n$ 、節の数を  $m$  とすると各基本コマンドの実行回数は、

$$(n-2) \times (\text{amplify} + 2 \times \text{append} + \text{merge}) + m \times (3 \times \text{get} + \text{merge})$$

である。即ち、変数の数と節の数にほぼ比例した時間で 3 SAT 問題を解くことができる。

## 【0115】

また、本発明において、`detect` 部分は、必ずしも反応結果を測定することを意味せず、反応結果が電子計算部へ利用可能に情報伝達されるか、或いは利用者が利用できる形態に変化または抽出された状態に特徴化されていればよい。また、`detect` 部分は測定可能な状態に特徴化されていればよく、測定を人が行ってもよい。従って、本発明において、分子計算部は、反応が終了すると共に利用者が利用できるような生成物または成果物を提供するところまでを実施すればよい。利用者は、本発明の装置により提供された生成物または成果物を種々の目的、例えば、診断、治療、創薬、学術的研究、生物学的データベースの構築、生物学的情報の解読等へと最も効率よく利用することができる。

## 【0116】

## (3) 分子計算部における計算；その2

DNA コンピュータに適した問題は、NP 完全問題のような純粋に数学的問題ではない。例えば、ゲノム情報解析のように入力データが分子で与えられるような問題とか、機能性分子の設計のように入出力が分子であるというだけでは

なく、機能の評価を電子コンピュータで行うことが困難な問題などである。

【0117】

DNAコンピュータによるゲノム情報解析を端的に示す例としてDNAチップによるゲノムスケールでの遺伝子発現情報解析が挙げられる。ゲノム計画は、30億塩基対のヒトゲノムの全塩基配列の決定から、10万から14万とも言われる遺伝子の機能解析に移りつつある。そのために必要とされるゲノムスケールでの遺伝子発現情報解析において、DNAチップは熱い注目を集めている。DNAチップは、遺伝子が発現されたときに細胞内に現れる転写産物分子を同定するためのDNAプローブ分子を基板上に多数、高密度に集積したものである。DNAチップにハイブリダイズされた転写産物分子がどのプローブとハイブリッドを形成したかにより、多数の遺伝子の発現状態を同時に調べることができる。このDNAチップが行っている作業は、電子コンピュータにおけるDNAシーケンサプローブ配列を問い合わせ配列とする配列検索そのものである。従ってDNAシーケンサチップは、配列検索のためのDNAコンピュータと見なすことができる。

【0118】

もし、DNAコンピュータではなく電子コンピュータでこの問題を解こうとするとどうなるか。10年ほど前から進められてきたcDNAプロジェクトにその答えを見ることができる。電子コンピュータは当然のことながら転写産物分子を入力データとして直接受理することはできない。従って、シーケンシングにより電子コンピュータで可読な形に、まず変換することが必要とされる。この変換は多種類の遺伝子転写産物分子が混合したままでは行うことはできない。クローニングにより、一つ一つの転写産物分子を分解しなくてはならない。遺伝子の同定は、遺伝子に特異的な塩基配列の存在を配列検索で調べることにより行われる。10万種類の遺伝子の発現情報を得るためには、10万回の配列検索が必要となる。更に、遺伝子の発現れえは同じ転写産物分子を見つけだす頻度で決定されるので、莫大な数のクローンについて解析を行わなくてはならない。従って、DNAチップを使用する場合に比べて遙かに長い時間と労力、コストが掛かることになる。

## 【0119】

このようにゲノムスケールでの遺伝子発現解析に置いてDNAチップというDNAコンピュータの優位性は明らかである。しかし、DNAチップはDNAシーケンサコンピュータというにはあまりにも単純すぎる。DNAプローブというセンサーを多数、高密度に集積したセンサーと言った方が適當かもしれない。しかし、この考え方を更に一方進めると、DNAコンピュータによりゲノム情報解析を行う一般的な計算パラダイムを提案することができる。即ち、ゲノム情報をまず正規直交化DNA塩基配列で表現した数字であるDNAシーケンサコード化数(DCN)の体型に変換する。その後、そのDCNに対するDNAシーケンサ計算を純粹に数学的問題を解くときのように行い、その計算結果からものゲノム情報を解析するのである。

## 【0120】

この方法では、以下に示すような2種類の核酸プローブ、即ち、プローブAおよびプローブBが使用される(図34a)。

## 【0121】

プローブAは、標的核酸の一部の領域の塩基配列Fに相補的な配列F'と、これに結合した結合分子からなる。

## 【0122】

ここで、結合分子は、互いに特異的に高親和性を有する2つの物質の内の何れか一方の物質である。例えば、ビオチンまたはアビジン若しくはストレプトアビジン等である。また、結合分子は、直接に配列F'に結合しても、或いは任意の配列を解して間接的に配列F'に結合してもよい。間接的に結合する場合の任意の配列は、如何なる塩基配列であっても、如何なる塩基数であってもよい。好ましくは、標的核酸上の塩基配列に非相補的な配列である。

## 【0123】

プローブBは、標的核酸の一部の領域の塩基配列Sに相補的な配列S'とフラッグとからなる。本例におけるフラッグは二本鎖からなる。前記二本鎖は、複数のユニットからなる任意の配列を有す。また、フラッグは、これ自身が標的核酸と結合はせず、また、これらは互いに如何なる相互作用も示さないことが必要で

ある。

#### 【0 1 2 4】

本方法に使用される配列 F' および配列 S' は、1 以上の塩基数を有し、より好ましくは 1 5 以上の塩基数を有する。

#### 【0 1 2 5】

ユニットの設計例を図 7 に示す。フラッグ F L の複数のユニットの各 1 ユニットは、1 0 塩基数以上としてよく、より好ましくは約 1 5 塩基数である。フラッグ F L のユニット数は、何れでもよいが、解析の容易さから 4 ユニットが好ましい。しかし、これに限られるものではない。

#### 【0 1 2 6】

複数の標的核酸を同時に検出する場合には、多種類のユニットを組み合わせてフラッグ F L を構築する。たとえば、S D、D 0、D 1、E D の 4 ユニットからなるフラッグ F L を設計する場合を例とすると、先ず、2 2 種類のユニットを設計し、その中から 2 種類を選択してプライマーとなる S D ユニットと、もう 1 つのプライマーである E D ユニットとする。残りの 2 0 種類のユニットを用いて、各標的核酸の種類毎に、選択する 2 つのユニットの種類を変えることにより D 0、D 1 を設計すると、1 0 0 種類の異なる核酸配列を検出することが可能である (図 3 5 A)。

#### 【0 1 2 7】

2 2 種類のユニットは、正規直交化された塩基配列により設計することが好ましい。正規直交化された塩基配列は T m 値が揃っており、相補配列以外とは安定したハイブリッドは形成しない。また、相補配列とのハイブリッド形成を阻害するような安定した 2 次構造は形成しない。これにより、最終的な検出時のミスハイブリを少なくし、ハイブリの形成速度を上げることが可能になる。したがって、検出精度を向上すること、および検出時間を短縮することが可能になる。また、ユニット数を増すことや、ユニットの種類を増すことにより、1 0 0 0 0 種類の異なる核酸配列をも検出することが可能である。

#### 【0 1 2 8】

図 3 4 を用いて、本例の方法を更に説明する。図 3 4 a に、4 ユニットからな

るフラッグFLの例を示した。該4ユニットは、ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction；以後、PCR増幅またはPCR反応と称す）においてプライマーとなるSDユニットと、標的核酸の種類を認識するための認識用ユニット、即ち、D0ユニットおよびD1ユニットと、およびもう1つのプライマー配列であるEDユニットとからなる。これらの各ユニットは、後の工程においては、夫々が読み取り枠となる。

## 【0129】

検出は、まず上記のプローブAとプローブBを、標的核酸と混合する（図34a）ことにより行う。このとき、試料に含まれる標的核酸は、複数の異なる核酸分子群であってもよい。例えば、検出されるべき標的核酸の種類が100種類以下であるならば、D0ユニットは、D0-1からD0-10の10種類の中から選択され、且つD1ユニットは、D1-1からD1-10の10種類の中から選択される（図35A）。

## 【0130】

次に、プローブA、プローブB、および標的核酸をハイブリダイゼーションに適した条件で一定時間インキュベーションし、ハイブリダイゼーションを行なう（図34b）。ハイブリダイゼーションの条件は、例1に示す通りでよい。

## 【0131】

かかるハイブリダイゼーションにより、プローブAおよびプローブBの両方が同一の標的核酸上に結合する（図34b）。

## 【0132】

次に、標的核酸にハイブリダイズしたプローブAおよびプローブBを連結する（図34c）。連結の条件は、例1に示す通りでよい。

## 【0133】

また、フラッグFLのT<sub>m</sub>値は、配列F' およびS' より高い温度に設計することが好ましい。これにより本検出方法におけるハイブリダイゼーション、ライゲーションおよび変性等の操作の加熱または冷却の際に、検出感度の低下をもたらすフラッグの変性を防ぐことが可能である。

## 【0134】

次に、得られたフラッグFLの情報をB/F分離する。具体的には、プローブ(A+B)に具備される結合分子を、その対となるべき結合分子を介して固相担体に補足する(図34e)。

## 【0135】

前記固相担体は、基板、ビーズ等の粒子、容器、繊維、管、フィルター、アフィニティ・カラム、電極等を用いることが可能であるが、好ましくはビーズである。

## 【0136】

次に、結合分子に捕捉された状態で、プローブ(A+B)のフラッグFLを変性し一本鎖にする(図34f)。得られた液相中の一本鎖配列FL'に対してPCR増幅を行なう(図34g)。上述したように、予めフラッグFLには、2つのプライマー配列SDおよびEDが配置してある。従って、このプライマー配列を利用してPCR反応が容易に行ない得る。また、このとき、PCRに使用する2つのプライマーの一方、たとえばSD配列に、ビオチン等の結合分子を結合しておくことが好ましい。このときのPCRの詳細な条件は、設計したフラッグFLに依存する。

## 【0137】

続いて、該PCR反応の終了後、結合分子を固相した固相担体に結合することによって、PCR産物である二本鎖配列を回収する(図34i)。ここで、固相化された担体は、前記結合分子と対になる結合対のもう一方の物質である。さらに、変性により配列FL'を除き、一本鎖配列FLのみを固相担体上で回収する(図5i)。

## 【0138】

続いて、固相上の一本鎖フラッグ配列FLの解析を行なう。まず、一本鎖フラッグ配列FLが結合した前記固相担体を10等分する(D1ユニットがD1-1からD1-D10の場合)。各々に、標識分子と結合したD1-1'からD1-10'配列の一つおよび全てのD0'配列(D0-1'からD0-10')を加え、フラッグ配列FLにハイブリダイズする。

## 【0139】

続いて、ハイブリダイズした2つの核酸分子をライゲーションにより連結する。ここで、ライゲーションの条件および標識物質に関する定義は上述した通りである。その後、変性により連結された分子を液相に回収する。

#### 【0140】

得られた標識された核酸分子の解析は、予めD0-1からD0-10の核酸分子を固相化したDNAチップまたはDNAキャピラリー等に対して、ハイブリダイズすることにより行うことができる。特に、DNAキャピラリーは、D0-1からD0-10で10等分に分けられたものを同時に処理できるので、これにより分析は容易になるであろう。

#### 【0141】

例えば、各10種類のD0-1からD0-10と、D1-0からD1-10の配列を用いてフラッグFLを設計した場合、図35Aの1の位置にはD0-1に相当する配列が固定され、標識されたD1-1'分子と連結された拡散分子63にハイブリダイズされる。同様に、他の位置には列により相当するD0配列が固定され、行により相当するD1'分子と連結された拡散分子にハイブリダイズされる。このような行列の配置を、後述するDNAキャピラリーに対して用いる(図35B)と解析が容易に行える。

#### 【0142】

ここでは、10種類のユニットを用いた例を挙げたが、ユニットの種類は10種類に限られるものではなく、それ以下でも、それ以上でもよい。

#### 【0143】

ここで使用する「DNAキャピラリー」とは、標的核酸を検出するための装置であり、その内側に該標的核酸に対する相補的配列が結合されており、該相補的配列に標的核酸を結合することにより、該標的分子を検出する装置をいう。図35Bに示す通り、多数のDNAキャピラリーを同時に使用し、且つ斜線で示した部分に、互いに異なるプローブを配置することにより、同時に多くの標的核酸を検出することが可能である。

#### 【0144】

また、本方法では、フラッグ配列FLの各ユニットには正規直交化配列が使用



されているので、実施されるハイブリダイズの反応温度等の条件を均一化することが可能である。これにより、ミスハイブリを防止でき、高い精度が得られる。また、同一条件の下で一度に多くの解析を行なうことが可能であるため、検出時間の短縮化を達成することが可能である。また、本方法により複雑なゲノム情報をDNAの塩基配列で表現した数値に変換することも可能となり、DNA分子反応を利用した計算を行うことにより、多種類の情報や、互いに連鎖した複雑な遺伝子情報を容易に解析することが可能になる。また、コード化したのちに容易にコード化核酸を増幅できるので、少ないコピー数の標的配列であっても正確に且つ定量的に検出することが可能である。また、コード化することにより、多くの情報を圧縮することが可能である。従ってDNAチップまたはキャピラリーアレイ等の検出手段の所要数を節約することが可能である。

#### 【0145】

ここで使用する「エンコード反応」とは、ある塩基配列を、正規直交化塩基配列で表現されるコードに変換することをいう。上述の図34aからfの工程がこれに相当する。

#### 【0146】

また、ここで使用する「デコード反応」とは、前記で変換されたコードの読み取りを行ない、それにより元の情報を復元することをいう。上述の図34jの工程がこれに相当する。

#### 【0147】

この方法では、上述したような1種類の標的核酸を検出するのみに留まらず、複数種類のフラッグ配列を設計すれば、同様な工程を経ることにより複数種類の標的核酸を同時に検出することも可能である。

#### 【0148】

##### 【実施例】

##### 1. 分子計算

上述で説明した数4のプログラムを本発明の分子計算装置を用いて実行した。装置の構成を以下に記す。該プログラムを実行した装置の構成を示す。本装置はプレシジョン・システム・サイエンス社、PSS社の核酸自動抽出装置SX8G

を改造して製作した。本装置は制御のためのインテル社製PentiumIII CPUを搭載した、OSがWindows98のコンピュータ（即ち、電子計算部）と、実験を実際に行うための試薬槽と反応槽、XYZの位置制御のできるピペッタと、予備のピペッタ用チップ、温度をコンピュータで制御できるサーマルサイクラ（MJ Research社製のPTC-200）からなる実験ロボット（即ち、分子計算部）からなる。分子計算部の上から見た反应用部材の配置を図4に示す。

## 【0149】

これらの反応容器の間で溶液の受け渡しが行われる。ストレプトアビジン磁気ビーズによるオリゴヌクレオチドの抽出は、ピペッタの特殊チップとチップに近づけたり離したりできる永久磁石により行う。ただし、以上のシステムでは実行できなかった2つの操作、即ち1 $\mu$ L程度の微量の酵素分注は人力で行い、detect関数でのキャピラリゲル電気泳動は、ベックマン・コールター社製P/ACE-5510キャピラリ電気泳動システムにより実行した。

## 【0150】

試薬類とその初期配置を述べる。ライゲース酵素は先に述べたように人の手で分注するので装置外で保持した。分注はギルソン社製のピペットマン2 $\mu$ Lのピペッタを用いた。

## 【0151】

Xで表される各変数の値を示すオリゴヌクレオチドの長さは22塩基である。また、ここで $X_1^F X_2^F$ と記した場合5'端側から順に $X_1$ が真であることを表すオリゴヌクレオチド、 $x_2$ が偽であることを示すオリゴヌクレオチドの配列をもつ1本鎖オリゴヌクレオチドであることを示す。また、ここで、配列名が「 $[ ]$ 」に挟まれている場合は元の配列に相補的な配列を意味する。このため、例えば $[X_1^F X_2^F]$ ならば $X_1^F X_2^F$ に相補的なので、実際の配列は5端側から $X_2^F$ に相補的な配列、 $X_1^F$ に相補的な配列の順になっている。

## 【0152】

T<sub>2</sub>溶液( $X_1^T X_2^T$ 、 $X_1^F X_2^T$ 、 $X_1^T X_2^F$ 、 $X_1^F X_2^F$ それぞれ5 pmolをライゲーション用緩衝溶液20 $\mu$ Lに溶解した)をMTP25(

即ち、マルチタイタープレート25)に保持した。ライゲーション反応用緩衝溶液、ストレプトアビジン磁気ビーズ、B&W溶液(TE溶液にNaClを加えて、NaClが1Mなる濃度にした溶液を以降このように呼ぶ。この液はストレプトアビジン磁気ビーズにビオチン化オリゴヌクレオチドを捕獲したり、ハイブリダイゼーション反応を行うときに用いる)は図4のMTP27に保持した。

## 【0153】

また、5'端がビオチン標識されているビオチン化オリゴヌクレオチド $[bX_1^T]$ 、 $[bX_2^T]$ 、 $[bX_3^T]$ 、 $[bX_4^T]$ 、 $[bX_1^F]$ 、 $[bX_2^F]$ 、 $[bX_3^F]$ 、 $[bX_4^F]$ をそれぞれ10pmolずつB&W溶液20 $\mu$ Lに溶解したもの、5'端がリン酸化されているappendオリゴヌクレオチド $pX_3$ 、 $pX_3^T$ 、 $pX_3^F$ 、 $pX_4^F$ 、 $pX_4^T$ 、それぞれ10pmolをライゲーション緩衝溶液20 $\mu$ Lに溶解したもの、5'端にビオチン標識した連結オリゴヌクレオチド、 $[bX_2^TX_3^T]$ 、 $[bX_2^FX_3^T]$ 、 $[bX_2^TX_3^F]$ 、 $[bX_2^FX_3^F]$ 、 $[bX_3^TX_4^T]$ 、 $[bX_3^FX_4^T]$ 、 $[bX_3^TX_4^F]$ 、 $[bX_3^FX_4^F]$ それぞれ10pmolをライゲーション緩衝溶液20 $\mu$ Lに溶解したものをMTP25に配置する。これらのオリゴヌクレオチド溶液および緩衝溶液などは分子計算機動作中は室温で保持した。ライゲース、detect関数で用いるPCR用ポリメラーゼは装置の外で氷中で、PCR反応用緩衝溶液は室温で維持した。

## 【0154】

それぞれの関数に対応する反応での装置の動作を順を追って説明する。

## 【0155】

## (a) amplify関数

左端の引数の溶液をテンプレートとし、PCR増幅して元の溶液の濃度に維持して複数の溶液に分割する反応である。厳密にはもとの溶液のオリゴヌクレオチド濃度を測定してからでなければ増幅できないが、実際には最初の $T_2$ で各オリゴヌクレオチドが5pmolで20 $\mu$ Lの溶液に溶解しているので、20 $\mu$ Lの溶液に各オリゴヌクレオチドが数pmol溶解しているようにする。即ち、1溶液1オリゴヌクレオチドあたり2pmolとするならば、PCR反応液の組成は

次の通りである。

【0156】

ポリメラーゼ酵素（宝酒造）0.5  $\mu$ L（2.5 U）

増幅DNAの溶液 1 fmol程度の各々のオリゴヌクレオチドを含む

dNTP混合溶液 8  $\mu$ L（2.5 mM、付属品）

反応バッファ 10  $\mu$ L（10倍希釈で使用、付属品）

プライマー 各オリゴヌクレオチドにforward、reverse  
側とも5 pmolずつ準備

滅菌蒸留水 全液量が100  $\mu$ Lになるように加えた

増幅には宝酒造のPyrobest<sup>TM</sup> DNA PolymeraseのPCR増幅キットを用いた。反応温度条件は、以下の通りである。

【0157】

即ち、

1. 95℃ 30秒
2. 50℃ 30秒
3. 72℃ 60秒 1～3を30サイクル

である。

【0158】

PCR反応液の量は分割する溶液の数に応じて変えた。PCRの後、反応液からPCR産物をストレプトアビジン磁気ビーズ（ロシュダイアグノスティクス）で捕獲する。磁気ビーズ原液50  $\mu$ L（0.5 mg）をとり、ここから磁石により磁気ビーズのみを抽出して液をB&W溶液50  $\mu$ Lに置換する。この磁気ビーズ液とPCR反応液50  $\mu$ Lとを混ぜてPCR産物を捕獲する。捕獲した後、溶液をB&W溶液50  $\mu$ Lに置換し、88℃まで昇温して1本鎖オリゴヌクレオチドを解離させて抽出した。以上の作業は実験装置では行わず、人の手で行った。

【0159】

（b）get関数

get（T，+S）とget（T，-S）は一連の操作で同時に行う。

【0160】

(1) 抽出する溶液Tを50  $\mu$ L準備しHのサーマルサイクラに吐出した。

【0161】

(2) Tに捕獲する配列の相補鎖をビオチン化したオリゴヌクレオチドを20 pmolを含むB&W溶液50  $\mu$ Lをさらに加えて最初のハイブリダイゼーション反応を行った(下記反応温度条件の1, 2)。

【0162】

ピペッタは各MTPから液をとり反応を進める。反応温度条件は以下の通りである。即ち、

1. 95℃ 1分
2. 25℃ 10分(1から2までは10℃/分で温度を下げる)
3. 56℃ 3分(2から3までは10℃/分で温度を上げる)
4. 75℃ 3分(3から4までは10℃/分で温度を上げる)

であり、ピペッティングの作業時間を確保しながらサーマルサイクラを制御した。

【0163】

(3) 2の温度の途中で磁気ビーズ原液50  $\mu$ L分を分散したB&W溶液50  $\mu$ Lを混合し、磁気ビーズにビオチン化オリゴヌクレオチドのハイブリッドを捕獲した。磁気ビーズは再びサーマルサイクラー96穴MTP28に保持した。

【0164】

磁気ビーズ液は装置のピペッタに一度吸い込まれた後、ピペットのチップの中の空洞に保持される。このとき液を保持したチップにピペッタに取り付けた移動可能な永久磁石を接近させてビーズを集める。この間にピペットから排液して新たな溶液を吸引すれば溶液の置換や、2本鎖核酸の相補鎖の分離を行うことができる。磁気ビーズを溶液に分散するためには永久磁石を離して数回ピペッティングを行えば十分に攪拌されて磁気ビーズは溶液に分散する。

【0165】

(4) 次に3の温度条件に進む。ここではハイブリダイゼーションしなかったオリゴヌクレオチドを集めるコールドウォッシュ工程を行う。56℃にてB&W溶液50  $\mu$ Lにオリゴヌクレオチドを抽出しEのMTPに出力した。これがge

t (T, -S) の出力オリゴヌクレオチド溶液である。

【0166】

(5) 温度条件4のホットウォッシュ工程では4のようにさらに温度を上げて、磁気ビーズに捕獲されているオリゴヌクレオチドをコールとウォッシュと同様50  $\mu$ LのB&W溶液に抽出してMTP25に出力した。これがget (T, +s) の出力オリゴヌクレオチド溶液である。

【0167】

(c) merge関数

ごく簡単なピペッティング操作で実行した。ピペッターで混合する溶液をそれぞれ吸引し、全て1箇所のMTPのウェルに集めて混ぜることで実現した。

【0168】

(d) append関数

図6に示す反応である。appendするオリゴヌクレオチドが異なれば、別々の反応チューブで反応して同時に行った。

【0169】

(1) append反応する溶液を20  $\mu$ L、MTP25よりピペッターで吸引し、サーマルサイクラ28に吐出する。そのほか、append反応に必要な下記の溶液を反応用ウェル28まで運搬した。

【0170】

append反応には、New England Bio Labs社のTaqライゲースとその専用緩衝溶液とを用いた。

【0171】

反応溶液は以下の通りである。

【0172】

Taqライゲース (NEB)	0.5 $\mu$ L (20U)
反応DNAの溶液	原液20 $\mu$ L
反応バッファ	12 $\mu$ L (10倍希釈で使用、付属品)
連結オリゴヌクレオチド	各10 pmol
appendオリゴヌクレオチド	各10 pmol

滅菌蒸留水

全液量が120  $\mu$ Lになるように加えた。

【0173】

(2) ライゲーション反応を行った。サーマルサイクラの制御は下のように行った。ライゲーション反応を行ったのは1, 2温度条件の時である。反応温度条件は以下の通りである。即ち、

1. 95℃ 1分
2. 58℃ 15分 (1から2までは10℃/分で温度を下げる)
3. 25℃ 10分 (2から3までは10℃/分で温度を下げる)
4. 70℃ 3分 (3から4までは10℃/分で温度を上げる)
5. 74℃ 3分 (4から5までは10℃/分で温度を上げる)
6. 88℃ 3分 (5から6までは10℃/分で温度を上げる)

とした。

【0174】

(3) 反応温度条件3の25℃に下がってから磁気ビーズによる捕獲を行った。このとき、磁気ビーズを分散している溶液は捨て、ビーズをチップ内に保持したままサーマルサイクラ28からライゲーション緩衝溶液を直接ピペッタで吸引した。すなわちライゲーション緩衝溶液中で捕獲反応を行った。緩衝溶液が捕獲のための液でないため念のため60回吸引吐出を行い十分な量を捕獲できるようにした。磁気ビーズはサーマルサイクラ28に保持した。

【0175】

(4) 続いて1回目のコールドウォッシュを行った。核酸ハイブリッドの長さ  
と溶液の塩濃度から70℃が適温である。4の70℃まで昇温したらサーマルサイクラ28から磁気ビーズ液を吸引し、永久磁石でビーズを集め、溶液のみをMTP25に吐出した。この溶液は廃液である。

【0176】

(5) そのまま、ピペッタでMTP27のB&W溶液50  $\mu$ Lを吸引し、永久磁石を離して磁気ビーズを分散させてサーマルサイクラ28に戻した。サーマルサイクラ28では反応温度5にし、2回目のコールドウォッシュを実行した。ここでは(4)と同様に適温になったらサーマルサイクラ28から吸引し、永久磁

石でビーズを集めてB & W溶液のみをMTP 25に吐出した。この溶液も廃液である。

## 【0177】

(6) このあと、さらに再びピペッタでMTP 27のB & W溶液50  $\mu$ Lを吸引し、永久磁石を離して磁気ビーズを分散させてサーマルサイクラ 28に戻した。サーマルサイクラ 28で反応温度6になったとき、溶液中に append 反応の済んだ1本鎖オリゴヌクレオチドが解離してくるのでこれをサーマルサイクラ 28から吸引し、永久磁石でビーズを集め、溶液のみをMTP 25に吐出し保持した。

## 【0178】

## (e) detect 関数

図8に示す反応と、キャピラリゲル電気泳動による検出でおこなった。最終的に得られた解を表すオリゴヌクレオチドを含むであろう溶液をテンプレートとし、graduated PCRを行った。PCRはプライマーの組ごとに反応液を分けて行い、それぞれのPCR産物の有無および長さを検出することで解の配列を調べた。

## 【0179】

(1) 解を含むと考えられるオリゴヌクレオチド溶液をテンプレートとする。プログラム中で amplify によりオリゴヌクレオチドの濃度は維持されているので、それからテンプレート濃度を推定し液量を定める。

## 【0180】

PCR反応液の組成は、

ポリメレース酵素 (宝酒造) 0.5  $\mu$ L (2.5 U)

増幅するDNAの溶液 1 fmol程度の各々のオリゴヌクレオチドを含むだけの量

dNTP混合溶液 8  $\mu$ L (2.5 mM、付属品)

反応バッファ 10  $\mu$ L (10倍希釈で使用、付属品)

プライマー 各オリゴヌクレオチドに forward, reverse側とも 5 pmolずつ準備



滅菌蒸留水 全液量が100  $\mu$ Lになるように加えた  
とした。

## 【0181】

増幅には宝酒造のPyrobest DNA Polymerase PCR  
増幅キットを用いた。反応温度条件は、

1. 95℃ 30秒
2. 50℃ 30秒
3. 72℃ 60秒 1～3を30サイクルであった。

## 【0182】

本実験で用いたプライマーは次の12組である。

## 【0183】

$(X_1^T, [X_2^T])$ 、 $(X_1^T, [X_2^F])$ 、 $(X_1^T, [X_3^T])$ 、  
 $(X_1^T, [X_3^F])$ 、 $(X_1^T, [X_4^T])$ 、 $(X_1^T, [X_4^F])$ 、  
 $(X_1^F, [X_2^T])$ 、 $(X_1^F, [X_2^F])$ 、 $(X_1^F, [X_3^T])$ 、  
 $(X_1^F, [X_3^F])$ 、 $(X_1^F, [X_4^T])$ 、 $(X_1^F, [X_4^F])$ 。

## 【0184】

これらをMTP25の異なるウェルに保持しておく。PCR反応時にプライマー溶液はピペッタで吸引してサーマルサイクラ28の異なるウェルに吐出し、反応に必要な溶液を加えてサーマルサイクラ28を設定通りに動作させれば反応は完了する。この作業は容易に自動化できる。この後のキャピラリゲル電気泳動装置での試料のキャピラリへの導入も自動化できる。キャピラリゲル電気泳動ではベックマン・コールター社のds1000ゲルキットを使用した。プライマー $X_1^T$ にはHTCが標識されているため泳動像が観察された。今回の実施例では以上のdetectの作業はキャピラリゲル電気泳動も自動では行わず、人の手で行った。以上の方法でプログラムの各関数を実行して得られた結果が図11に示した。

## 【0185】

## 2. 遺伝子解析

DNAコンピュータによるゲノム徐放解析という計算パラダイムの有効性を示

すために、実際に遺伝子の発現情報解析を行うDNA計算の実験を行った。計算はダイナミックプログラミングで3SATの問題を解くときに使用するget、append、amplify、mergeおよびdetectの基本命令を用いて実行することができる。最初の計算反応はエンコード反応である。単一試験管内で行える計算反応で、遺伝子の転写産物の情報がappend命令によりDCNに変換される。変換テーブルは、アダプター分子A<sub>i</sub>で表現され、2桁n進数のDCNへの一対一対で変換される。すでに200以上のDCNを得ているので、2桁100進数のDCNにより10,000種類の遺伝子をエンコードすることができる。その後、amplify命令により増幅とn本の試験管への分注反応が行われる。最後にn本の試験管に対してappendとget命令によりDCNをデコードする計算反応が行われる。デコード反応はn本の試験に対して並列に行うことができる。移植断片対宿主病関連の転写産物に相当するDNAオリゴヌクレオチドを入力データとして実験を行ったところ、計算反応が特異的且つ定量的に進むことが確認された。

## 【0186】

DCNに対するDNA計算により、遺伝子の発現情報解析を行う方法は、DNAチップで直接に転写産物分子を解析する方法に比べて優れた点をいくつか有している。性質が一樣なDCNに変換してから増幅するので、もとの頻度分布を崩さずに増幅して解析することが可能である。また、DCNデコードで「get」命令を並列に行うためのDNAチップは、同じDCNの体系である限り同じものを使用することができる。その上、DNAプローブの数も大幅に少ない。DNAチップを作製する手間とコストが大幅に軽減される。更に、正規直交化されたプローブのハイブリダイゼーション反応は最適化されており、正確な計算処理を行うことが可能である。

## 【0187】

更にまた、本発明は、上述の記載に基づいて以下の方法および分子計算用ソフトウェアも提供する。即ち、電子計算部と分子計算部とを、電気学的プログラムが認識可能に表現された分子情報に基づいて一体的に機能させることを特徴とする分子計算方法を提供するものである。

## 【0188】

また、電子計算部と分子計算部とを具備する分子計算装置に適用するためのソフトウェアであって、前記電子計算部および／または前記分子計算部に適用され、前記電子計算部による計算作業と前記分子計算部による計算作業とを、各計算部で電気学的に認識可能な情報形式で機能させることを特徴とする分子計算用ソフトウェア、詳しくは、分子計算部により計算した情報を、電子計算部の電気学的プログラムに適合するような情報形式に変換する機能を有することを特徴とする分子計算用ソフトウェア、更に詳しくは、電子計算部により計算した情報を、分子計算部の計算作業に適合するような情報形式に変換する機能を有することを特徴とする分子計算用ソフトウェアを提供することである。

## 【0189】

本発明の分子計算ソフトウェアを用いることにより、上述の本発明の計算装置の実行を容易に行うことが可能である。また、当該分子計算ソフトウェアは、本発明の計算装置を総括して管理しても、またその構成要素の一部分を独立して管理しても、または構成要素の幾つかの部分を組み合わせて連動して管理してもよい。

## 【0190】

## 【発明の効果】

本発明の分子計算装置では、分子計算部と電子計算部とが互いに補完的に機能を分担している。従って、使い勝手がよく、その上、速い速度でNP完全問題を評価することが可能である。

## 【0191】

また、分子を直接的な入力とした演算が可能になるので、例えば、遺伝子解析に本発明を利用した場合には、実験誤差を最小に抑えることが可能である。即ち、核酸を符号化核酸に変換して装置内で処理するので実験誤差が抑えられる。また、本発明の計算装置の使用により計算時間およびランニングコストが削減できる。更に、遺伝子解析をプログラミングにより表現することで、実験を自動的に計算して実行することもできる。また、発現遺伝子を符号化OLA (Oligonucleotide Ligation Assay) を行うことにより符号化核酸に変換し、符号化核酸の3

’ と 5’ 末端にある共通配列により P C R 増幅すれば、正確にそれらの発現比を検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の分子計算装置を示すブロック図。

【図 2】

本発明の分子計算装置の処理フローチャート。

【図 3】

本発明の分子計算装置を示すブロック図。

【図 4】

本発明の分子計算装置の各部の配置を示す模式図。

【図 5】

コマンドの処理の概要を示すフローチャート。

【図 6】

コマンドの処理の概要を示すフローチャート。

【図 7】

コマンドの処理の概要を示すフローチャート。

【図 8】

コマンドの処理の概要を示すフローチャート。

【図 9】

プログラムの流れを示すフローチャート。

【図 1 0】

配列の同定方法の例を示す概念図。

【図 1 1】

配列同定の結果を示すチャート。

【図 1 2】

遺伝子検出反応工程における各分子の状態を示す模式図。

【図 1 3】

標的が存在した場合の反応系における各分子の状態を示す模式図。

【図 14】

ストレプトアビジン磁気ビーズによる捕獲工程における各分子の状態を示す模式図。

【図 15】

DCN<sub>i</sub> の抽出工程における各分子の状態を示す模式図。

【図 16】

抽出工程で得られた DCN<sub>i</sub> に相補的な配列の増幅の模式図。

【図 17】

図 16 の増幅により得られた増幅産物を捕獲する工程における各分子の状態を示す模式図。

【図 18】

熱変性により一本鎖化する工程における各分子の状態を示す模式図。

【図 19】

発現遺伝子の情報を存在分子に変換する工程における各分子の挙動を示す模式図。

【図 20】

非発現遺伝子を検出し、不存在分子に変換するための最初の工程における有無変換オリゴヌクレオチドと存在分子の反応を示す模式図。

【図 21】

ある非発現遺伝子のための有無変換オリゴヌクレオチドの状態を示す模式図。

【図 22】

有無変換オリゴヌクレオチドの抽出工程における分子の状態を示す模式図。

【図 23】

ストレプトアビジンを固定した磁気ビーズによる DCN<sub>k</sub> \* の捕捉とハイブリダイゼーションによる抽出工程における各分子の状態を示す模式図。

【図 24】

演算用核酸を示す模式図。

【図 25】

演算用核酸と存在分子および不存在分子とのハイブリダイゼーション工程にお

ける各分子の状態を示す模式図。

【図 2 6】

図 2 5 の工程の後に演算用核酸にハイブリッドした前記分子を伸長する工程における各分子の状態を示す模式図。

【図 2 7】

マーカーオリゴヌクレオチド  $M_1$  および  $M_2$  による計算結果の検出工程における各分子の状態を示す模式図。

【図 2 8】

不存在分子の増幅のために不在分子を抽出回収する工程における各分子の状態を示す模式図。

【図 2 9】

不存在分子の増幅のための PCR 工程における各分子の状態を示す模式図。

【図 3 0】

図 2 9 の工程により生じた増幅産物を捕獲する工程における各分子の状態を示す模式図。

【図 3 1】

図 3 0 の工程で回収された増幅産物を 1 本鎖にする工程における各分子の状態を示す模式図。

【図 3 2】

図 3 1 の工程の 1 本鎖に対する不存在分子のハイブリダイゼーションを行う工程における各分子の状態を示す模式図。

【図 3 3】

演算用核酸のランダムライブラリの作製方法において使用する連結用相補核酸と、連結対象となる演算用核酸の一部を示す模式図。

【図 3 4】

遺伝子解析のためのエンコード反応とデコード反応とを示すフローチャート。

【図 3 5】

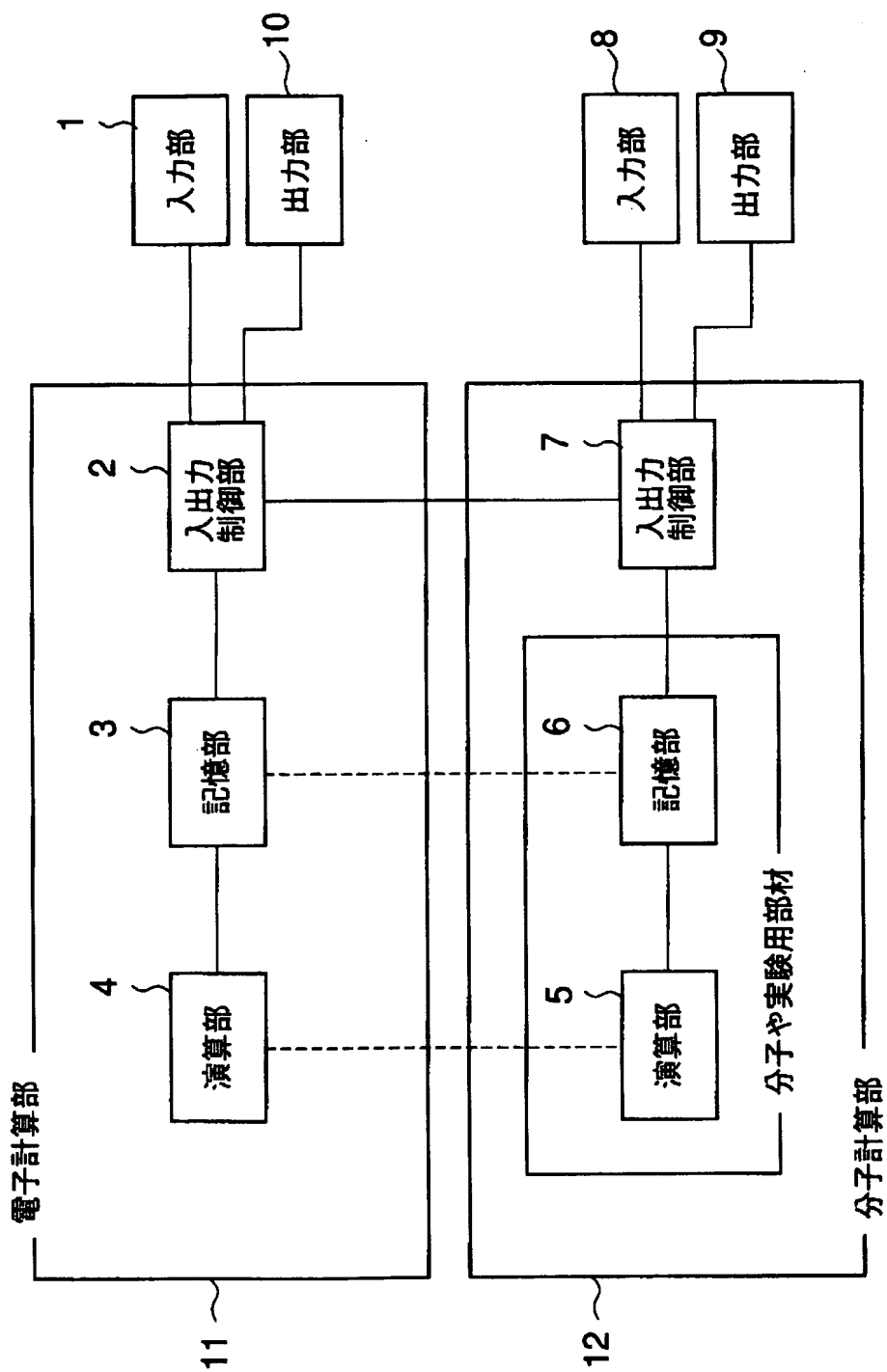
遺伝子解析のための分子設計例を示す図。

【符号の説明】

31. プライマー      32. プライマー      33. 存在分子      34. 有無変換  
オリゴヌクレオチド      35. 有無変換オリゴヌクレオチド      36. 不存在分  
子      37. ヌクレオチド      38. 演算用核酸      39. 連結用相補核酸  
50. プローブA      51. プローブB      52. 標的核酸      53. 結合分子  
54.      固体担体      55. 結合分子に対して高親和性を有する物質

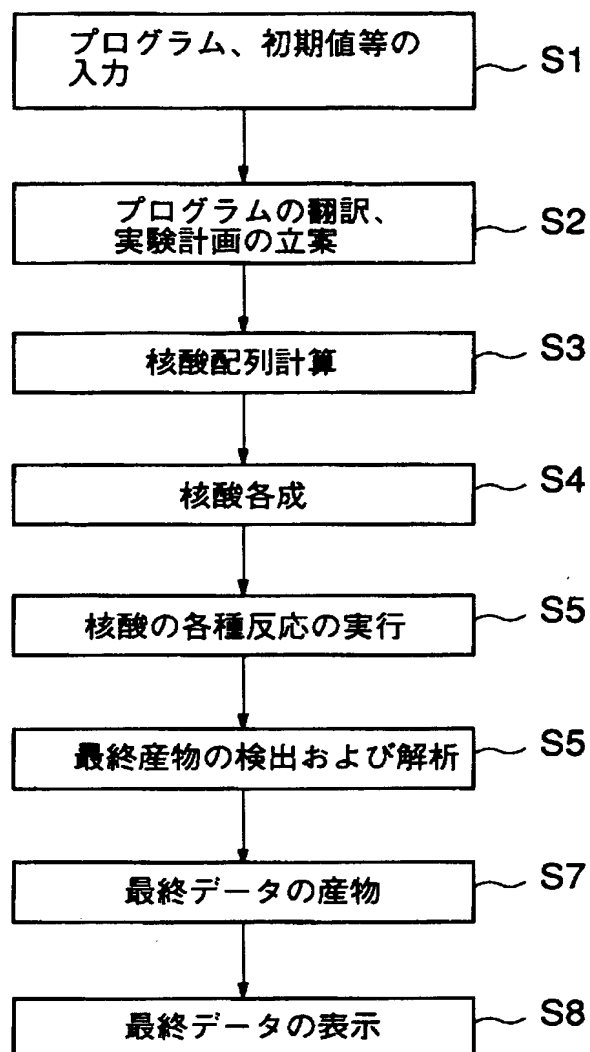
【書類名】 図面

【図 1】



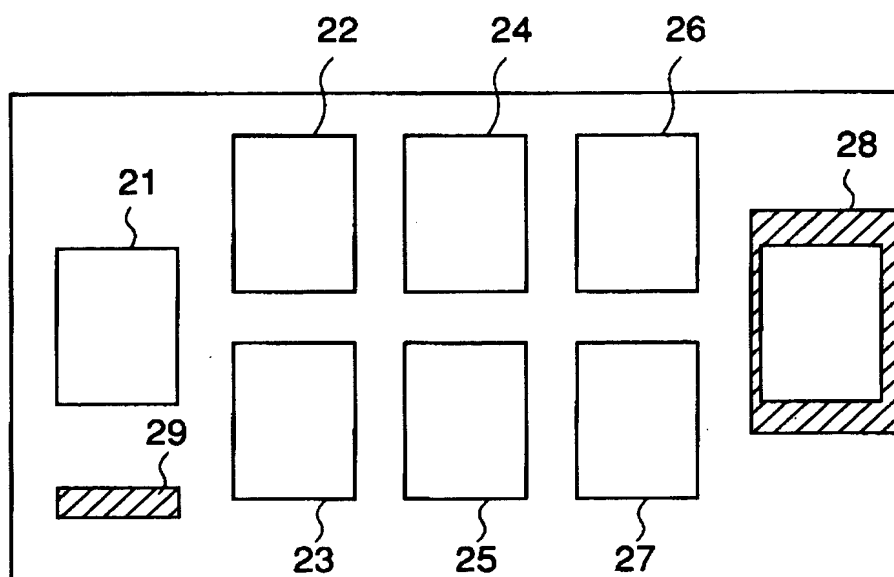


【図 2】





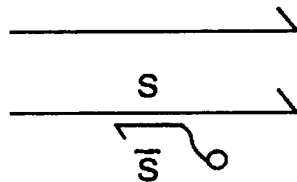
【図 4】



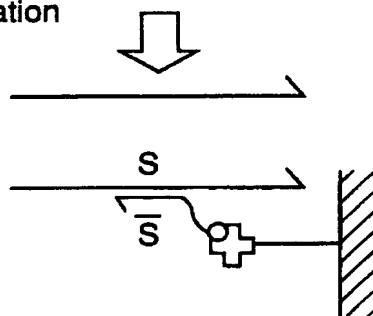
【図 5】

get(T,+s),get(T,-s)

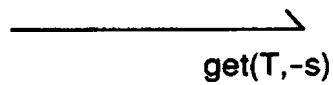
annealing



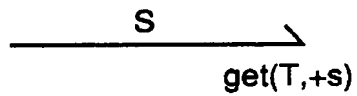
immobilization



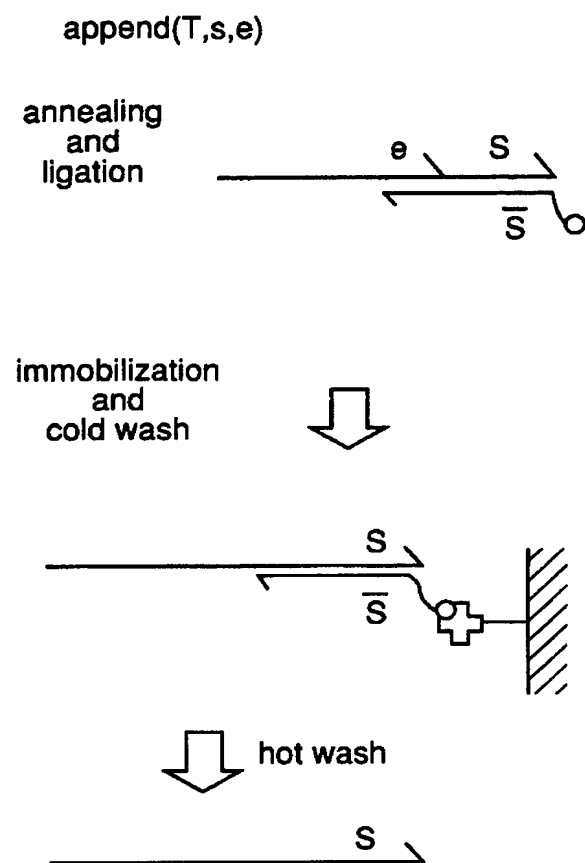
cold wash



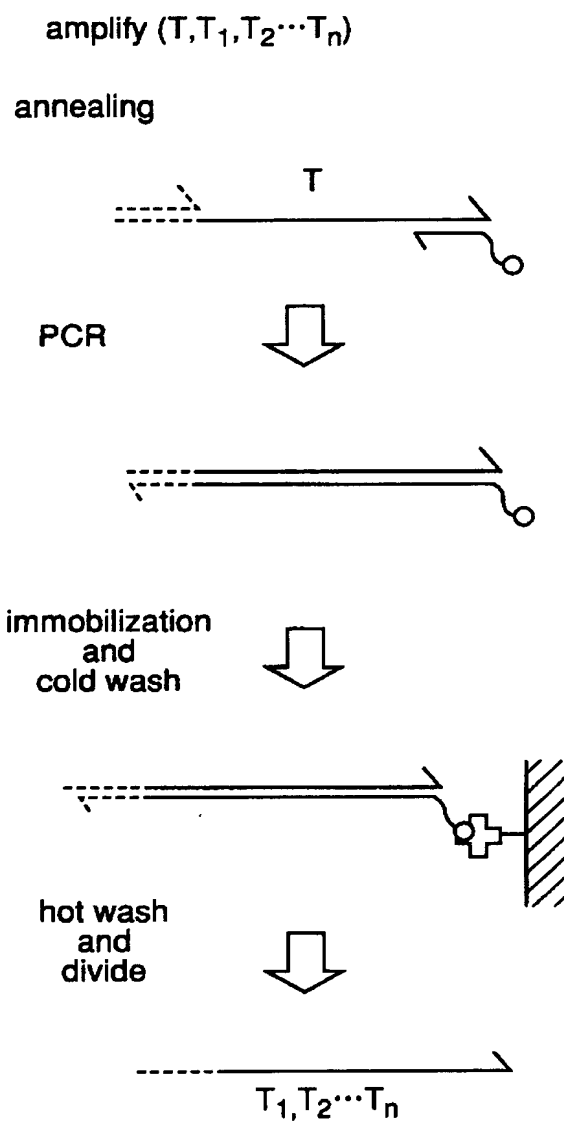
hot wash



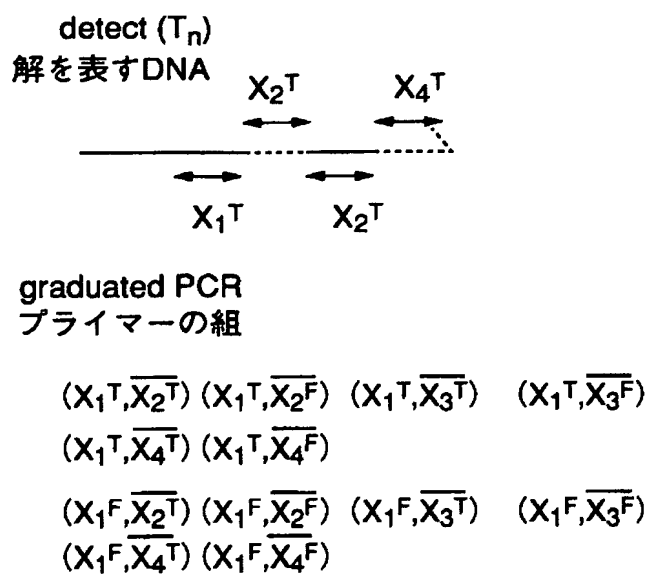
【図 6】



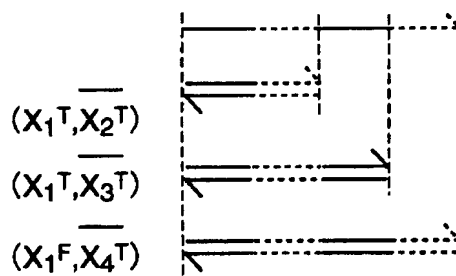
【図 7】



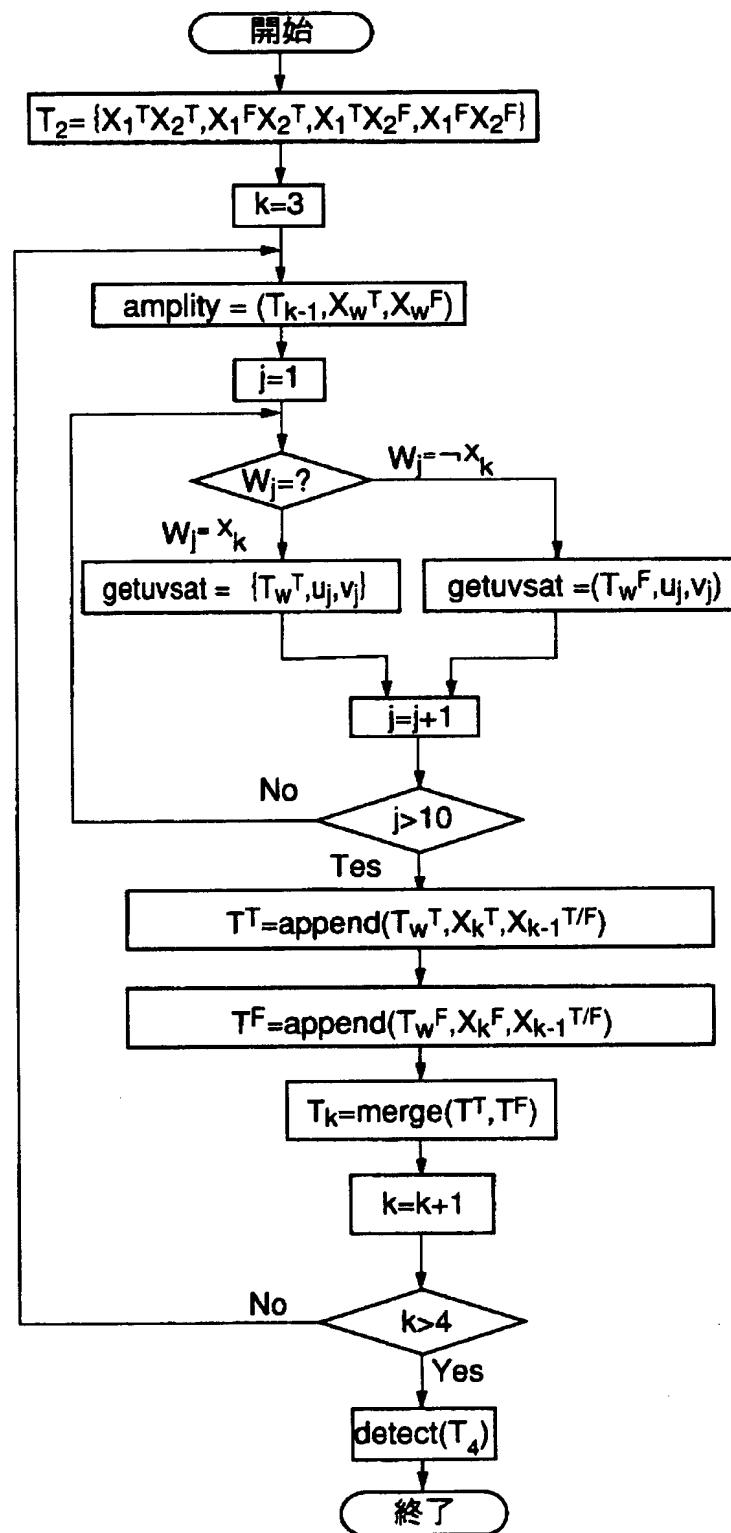
【図 8】



各種プライマーのPCR産物



【図 9】



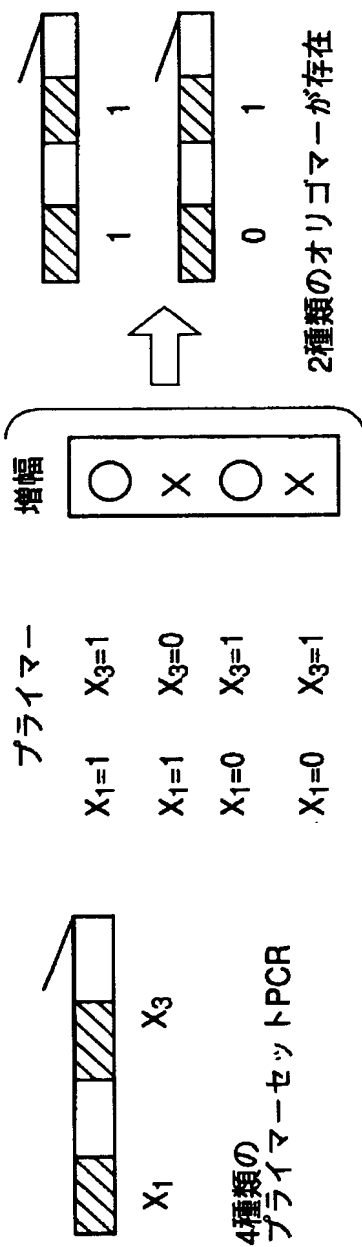


【図 10】

配列の同定方法

- ・シーケンシング
- ・graduated PCR DNA分子における2つの変数領域の値を調べる方法

[graduated PCRの例]



【図 11】

graduated PCR DNAによる解の配列の同定

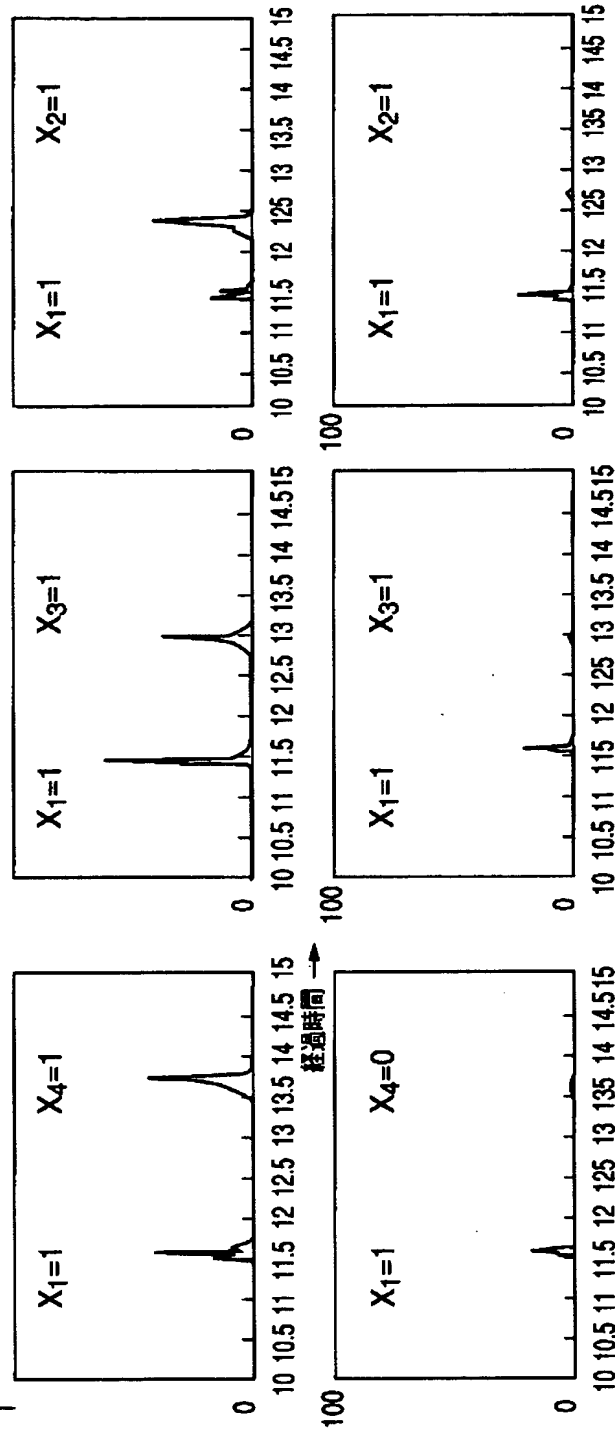
キャピラリゲル電気泳動 (変性ゲル使用)

蛍光強度  
(RFU)

88mer産物

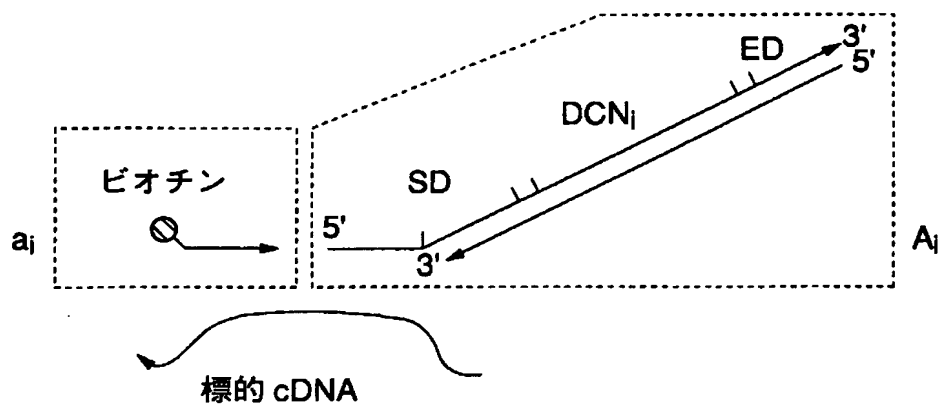
66mer産物

44mer産物

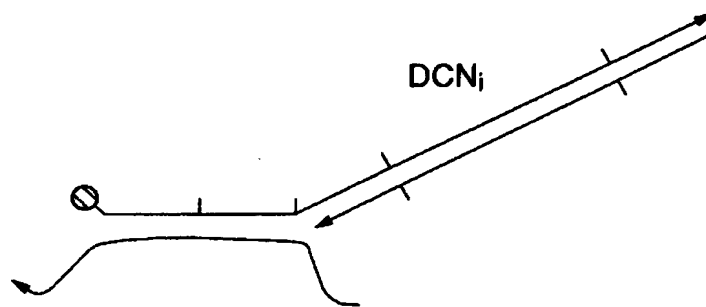


解: {1,1,1,1}

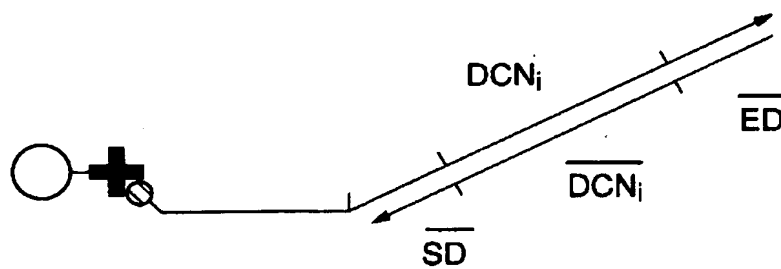
【図 12】



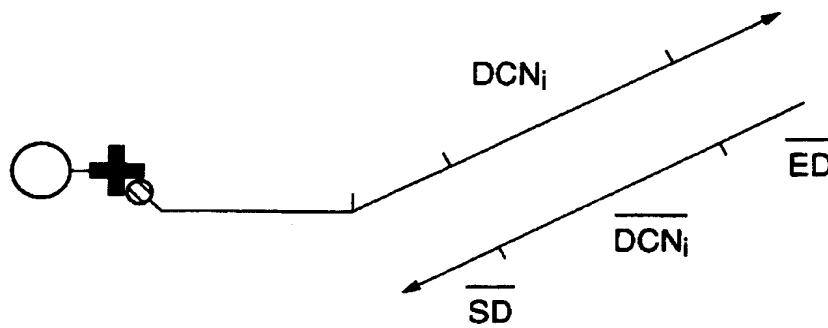
【図 13】



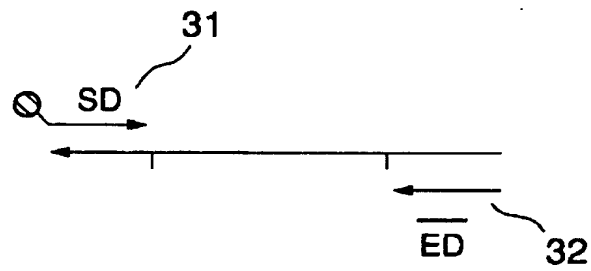
【図 14】



【図 15】



【図 16】



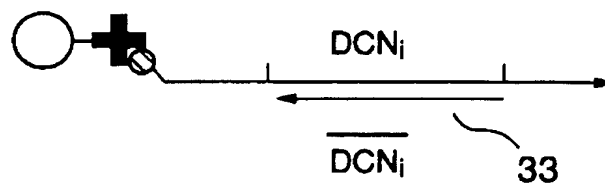
【図 17】



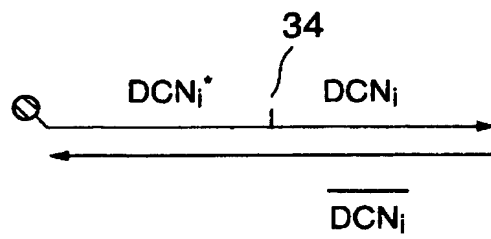
【図 18】



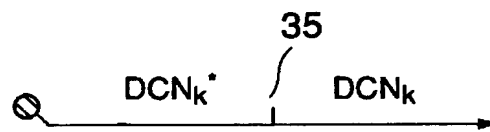
【図 19】



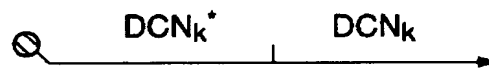
【図 2 0】



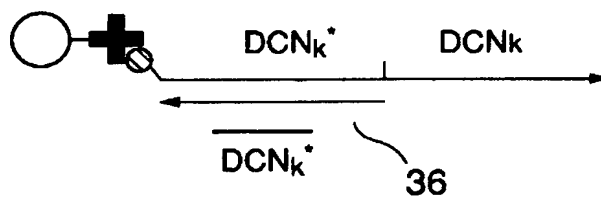
【図 2 1】



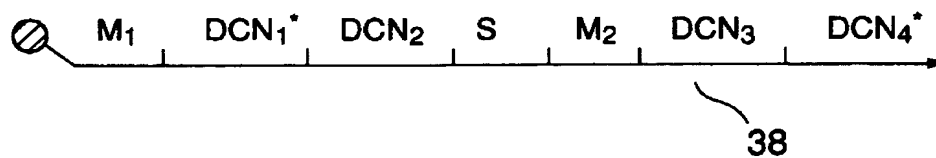
【図 2 2】



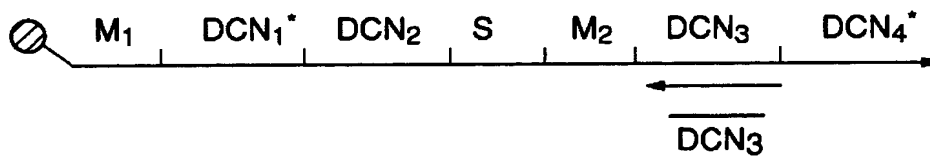
【図 2 3】



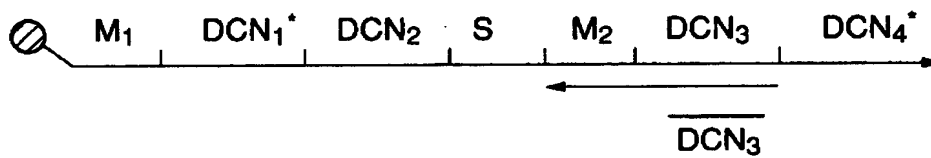
【図 2 4】



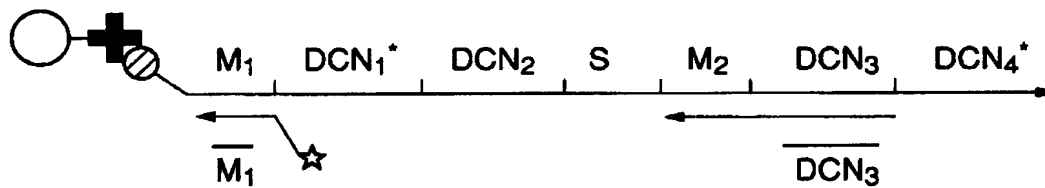
【図 25】



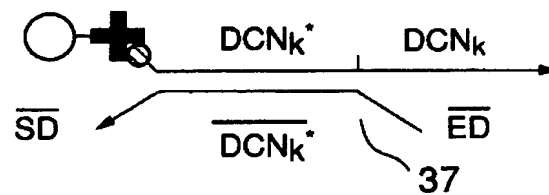
【図 26】



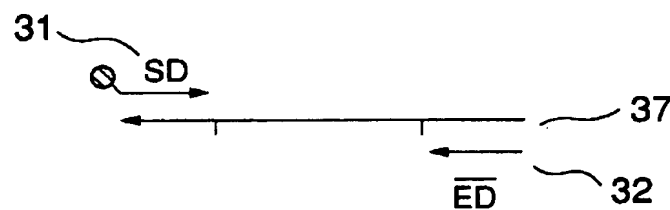
【図 27】



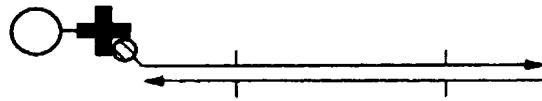
【図 28】



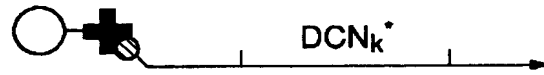
【図 29】



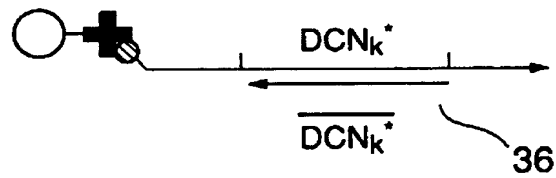
【図 30】



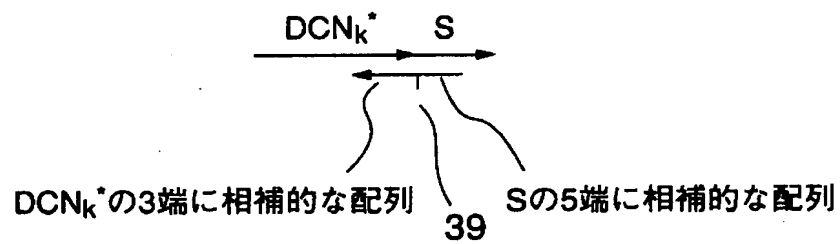
【図 31】



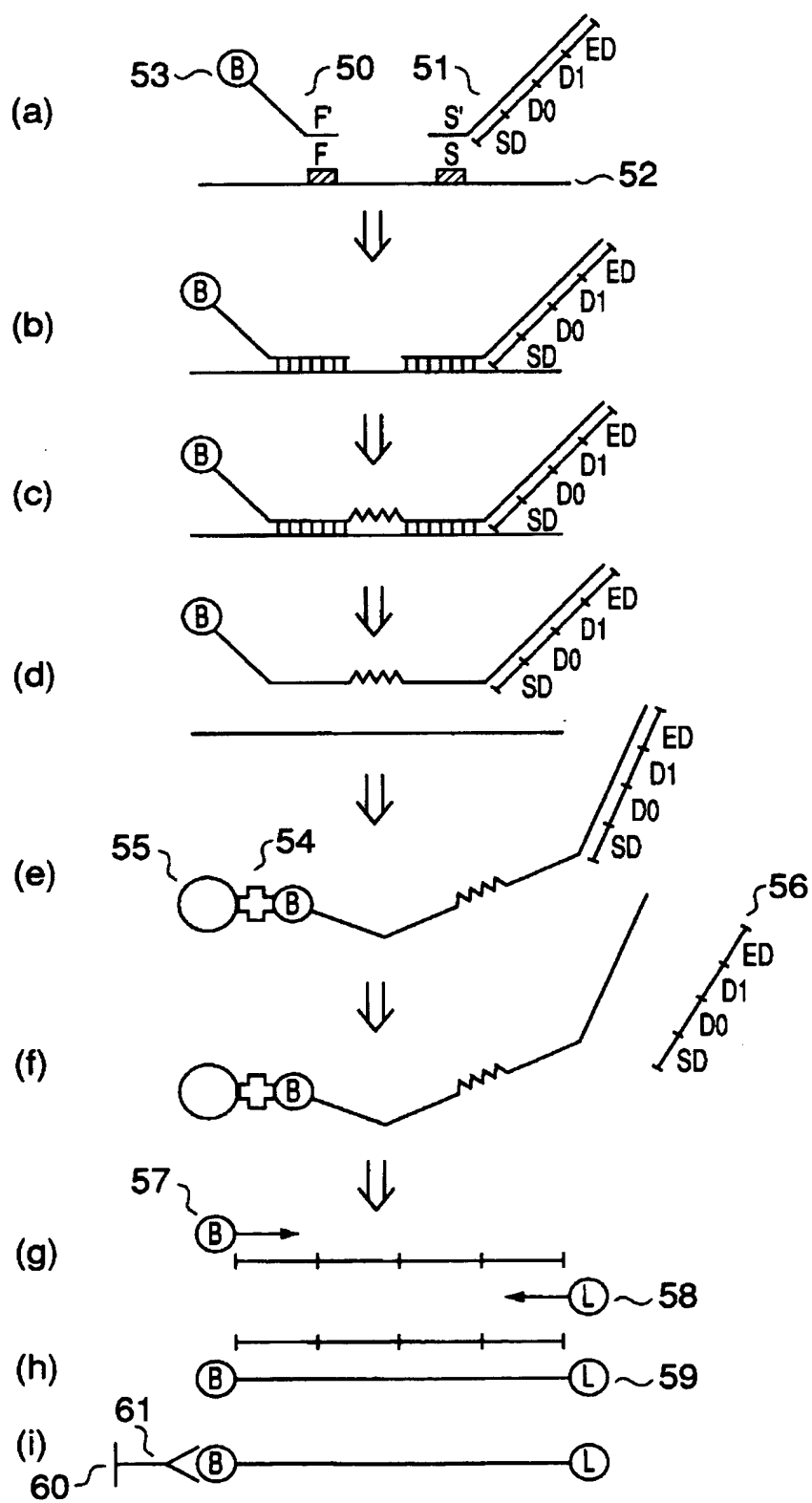
【図 32】



【図 33】



【図 34】

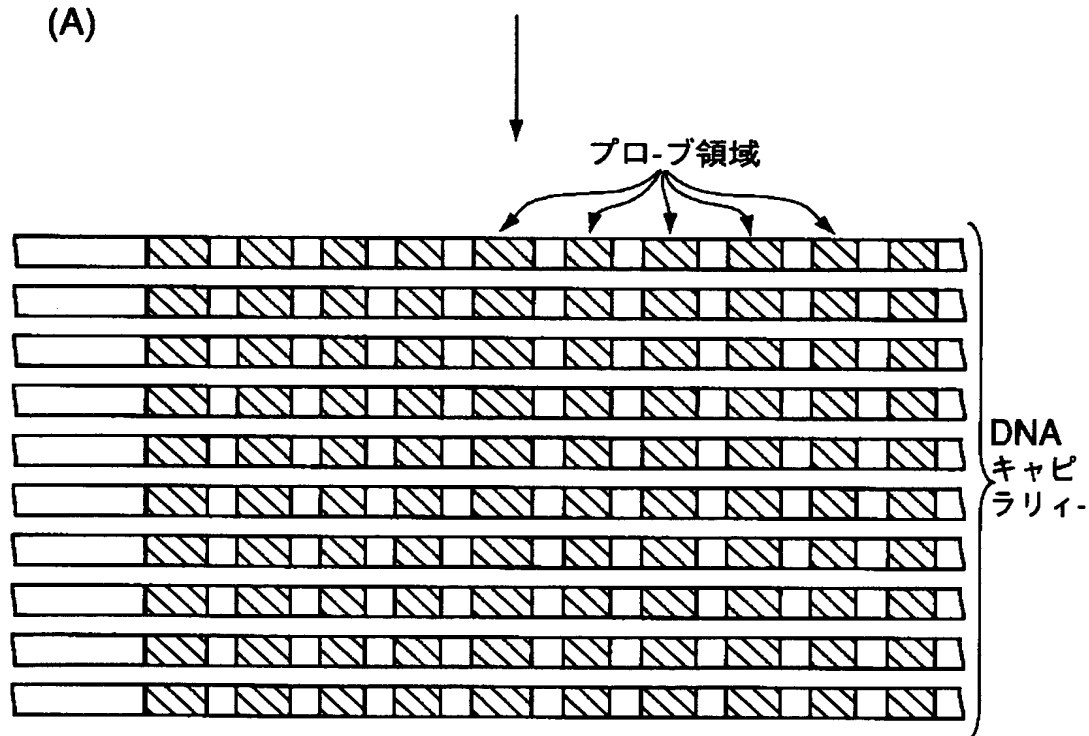




【図 35】

		D0									
		D0-1	D0-2	D0-3	D0-4	D0-5	D0-6	D0-7	D0-8	D0-9	D0-10
D1	D1-1	1									
	D1-2										
	D1-3										
	D1-4										
	D1-5										
	D1-6										
	D1-7										
	D1-8										
	D1-9										
	D1-10										

(A)



(B)

【書類名】                      要約書

【要約】

【課題】    従来の分子計算では人の手で行った作業を電子計算部で自動的に行い、分子計算機で実現が難しい機能、例えば、プログラムの入力や表示等を電子計算部で実現する核酸分子を用いた計算装置、特に、NP完全問題等の困難な問題を解くために有利な超並列計算を高速に行う分子計算装置を提供する。

【解決手段】    電子計算部と分子計算部とを具備する分子計算装置であって、前記電子計算部が、実質的に分子計算部の機能を制御することを特徴とする分子計算装置。

【選択図】        なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000376]

1. 変更年月日 1990年 8月20日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号  
氏 名 オリンパス光学工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [599000980]

1. 変更年月日 1998年12月25日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都中野区東中野2丁目7番14号  
氏 名 三井情報開発株式会社